

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-502651

(43) 公表日 平成7年(1995)3月23日

第1部門第1区分

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/12			
A 6 1 K 31/70	A E D	9454-4C	
48/00		8314-4C	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願平5-511170
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)12月15日
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)6月15日
(86) 国際出願番号	PCT/US92/10904
(87) 国際公開番号	WO93/12251
(87) 国際公開日	平成5年(1993)6月24日
(31) 優先権主張番号	808, 523
(32) 優先日	1991年12月16日
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	970, 462
(32) 優先日	1992年11月2日
(33) 優先権主張国	米国 (US)

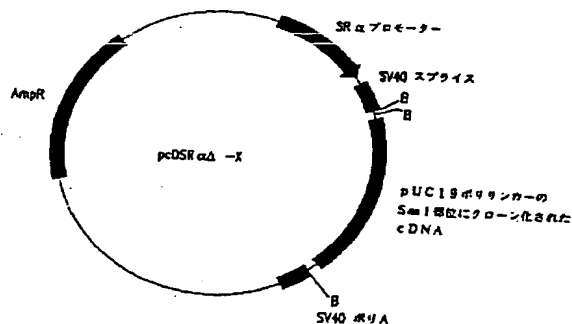
(71) 出願人	ベイラー・カレッジ・オブ・メディシン アメリカ合衆国77030テキサス州ヒュース トン、ワン・ベイラー・プラザ (番地の表 示なし)
(72) 発明者	スミス、ジェームス・アール アメリカ合衆国77030テキサス州ヒュース トン、クリフウッド10311番
(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 老化細胞由来DNA合成阻害因子

(57) 【要約】

老化細胞から得られる発現ベクターcDNAライブラリーは、DNA合成阻害因子をコードするcDNAクローンを分離するのに用いられる。このような阻害因子は、細胞老化および加齢において役割を果たしている。アンチセンス核酸は、DNA合成の阻害を低減する。



請求の範囲

1. 受容細胞におけるDNA合成を阻害する能力のあるタンパク質をコードする核酸分子。
2. 該分子がDNAであり、かつDNAプラスミドに組み込まれている、請求の範囲1項記載の核酸分子。
3. 該分子がSD1-1である、請求の範囲2項記載の核酸分子。
4. 該分子が「図5<配列番号1>」で示される配列を有する、請求の範囲2項記載の核酸分子。
5. 該プラスミドがpCD5R α Δである、請求の範囲3項記載の核酸分子。
6. 該分子がRNAである、請求の範囲1項記載の核酸分子。
7. 請求の範囲6項記載のRNA分子に相補的な配列と、該分子を生理学的条件下でもう一方とハイブリダイズさせるのに十分な長さを有する核酸分子。
8. RNA分子である、請求の範囲7項記載の核酸分子。
9. DNA分子である、請求の範囲7項記載の核酸分子。
10. 受容細胞におけるDNA合成を阻害する能力を有するタンパク質をコードする核酸分子の有効性をヒト細胞に与えることを含んで成る、ヒト細胞におけるDNA合成を阻害する方法。
11. 該細胞が癌細胞である、請求の範囲10項記載の方法。
12. 該細胞がイン・ビトロ培養における細胞である、請求の範囲10項記載の方法。
13. 受容細胞におけるDNA合成を阻害する能力を有するタンパク質をコードするRNA分子に相補的な配列を有し、該核酸分子および該RNA分子を生理学的条件下でもう一方とハイブリダイズさせるのに十分な長さを有する核酸分子の有効性をヒト細胞に与えることを含んで成る、阻止または老化ヒト細胞におけるDNA合成の阻害を抑制解除させる方法。
14. 該細胞が成皮細胞である、請求の範囲13項記載の方法。
15. 該細胞が胎鼠または大鼠組織に存在する、請求の範囲13項記載の方法。

子に対する細胞の応答機能減退を伴う。従って、細胞老化は、細胞の増殖能力の喪失を食すものである。イン・ビトロでの細胞老化現象を説明するため、様々な理論が提議されているが、実験的証拠は、増殖能力の年齢依存性喪失が遺伝子プログラムの機能であろうことを示唆している（オーゲル、J. E., プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(U.S.A.), 49巻、517頁(1963年); デ・マース、R.等、ヒューマン・ジェネティクス、16巻、87頁(1972年); M. ブラックワルド、ミューテーション・リサーチ、44巻、401頁(1977年); マーティン、G.M.等、アメリカン・ジャーナル・オブ・パソロジー、74巻、137頁(1974年); スミス、J. R.等、Mech. Age. Dev., 13巻、387頁(1980年); カークウッド、T. B. L.等、セオリーカル・バイオロジー、53巻、481頁(1975年))。

イン・ビトロにおけるヒト細胞増殖能での細胞融合研究は、細胞老化の静止状態が、増殖状態よりも優勢であることを示している（ペレイラスミス、O. M.等、ソマティック・セル・ジェネティクス、8巻、731頁(1982年); ノルウッド、T. H.等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(U.S.A.), 71巻、223頁(1974年); スティン、G. H.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、130巻、155頁(1979年))。

老化現象に対する洞察が、老化細胞および若い（即ち、非老化）細胞を融合して、ヘテロダイカル（heterodikaryons）を形成する研究から得られている。ヘテロダイカル融合の「若い」側で老化を引き起こすためには（DNA合成の阻害により判定するとき）、融合する前に、老化細胞でタンパク質合成が起ころなければならない（バーマー、G. C.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、94巻、187頁(1982年); ドレッチャー・リンカーン、C. K.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、144巻、455頁(1983年); バーマー、G. C.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、145巻、708頁(1983年); ドレッチャー・リンカーン、C. K.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、153巻、208頁(1984年))。

発明の分野

本発明は、組織DNA技術の分野のものである。本発明は、細胞の能力を老化させる遺伝子配列およびタンパク質に関する。本発明は、政府基金により援助されたものである、該政府は本発明について一定の権利を有する。

関連出願の相互参照

本出願は、本明細書に引用して組み込まれた米国特許出願07/808,523号（1991年12月16日出願）の一部を構成するものである。

発明の背景

正常なヒト二倍体細胞は、有限の増殖能力を有している（ヘイフリック、L.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、25巻、585頁(1961年); ヘイフリック、L.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、37巻、614頁(1965年))。実際に、イン・ビトロでの培養条件下では、培養ヒト細胞は最大限に増殖しても約80累積集団倍加(cumulative population doublings)までである。そのような細胞の増殖能力は、細胞が経年する累積集団倍加の関数であることが見いだされた（ヘイフリック、L.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、25巻、585頁(1961年); ヘイフリック、L.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、37巻、614頁(1965年))。この能力は、また細胞提供のイン・ビトロ年齢に反比例している（マーティン、G.M.等、ラボラトリ・インベスティゲーション、23巻、86頁(1979年); ゴールドシュタイン、S.等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(U.S.A.), 64巻、155頁(1969年); シュナイダー、E. L.等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(U.S.A.), 73巻、3584頁(1976年); レギルティ、Y.等、ゲレオントロジヤ、19巻、303頁(1973年))。

増殖能力に対するその能力を消滅した細胞は、「老化」してしまったと考えられる。イン・ビトロでの細胞老化は、形態学的変化により示され、かつ外来成長因

同様に、老化細胞増殖mRNAの若い細胞増殖細胞へのマイクロインジェクションが、若い細胞のDNA合成能力（ランバキン、C. K.等、サイエンス、232巻、393頁(1986年)）と細胞の細胞周期のS（静止）期に入る能力のいずれをも阻害することが見いだされている（ランバキン、C. K.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、160巻、544頁(1985年))。研究者らは、イン・ビトロで老化細胞内で増殖されるユニークなmRNAを同定した（ウェスト、M. D.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、184巻、138頁(1989年); ジョルダノ、T.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、185巻、399頁(1989年))。

ヒト二倍体内皮細胞は、これらの細胞がイン・ビトロで細胞老化を模倣することから、細胞老化研究の代替細胞型を与えるものである（マシアー、T.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、91巻、420頁(1981年); ゴードン、P. B.等、イン・ビトロ、19巻、661頁(1983年); ジョンソン、A.等、Mech. Age. Dev., 18巻、1頁(1982年); ソーントン、S. C.等、サイエンス、222巻、623頁(1983年); ヴェン・ヒンスベルグ、V. W. M.等、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、42巻、101頁(1986年); ニコラス、W. W.等、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、132巻、453頁(1987年))。

加えて、ヒト内皮細胞は、様々な機能の可逆的表現型を発現する能力がある。内皮細胞は、静止期の静止および非末端分化型を示す（フォークマン、J.等、ネイチャー、288巻、551頁(1980年); マシアー、T.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、94巻、511頁(1982年); マドリ、J. A.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、97巻、153頁(1983年); モンテサノ、R.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、99巻、1706頁(1984年); モンテサノ、R.等、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、34巻、460頁(1988年))。

イン・ビトロにおけるヒト細胞分化の経路は、イン・ビトロでの成長因子誘導内皮細胞増殖を阻害するサイトカインにより媒介される細胞静止状態の誘導に

関与することが示唆されている (ジェイ、M.等、サイエンス、228巻、882頁 (1985年) ; マドリ、J. A.等、イン・ビトロ、23巻、387頁 (1987年) ; クボタ、Y.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、107巻、1589頁 (1988年) ; イングバー、D. E.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、107巻、317頁 (1989年))。

内成細胞増殖の阻害因子 (inhibitors) は、イン・ビトロでの内成細胞分化中に引き起こされるごく初期の転写事象の調節因子としても機能しており、キメラリーゼ、腎状内皮細胞表型形成の阻害因子として機能しており、イン・ビトロでの内成細胞増殖の阻害因子として機能している (マシアー、T.等、イン・ビトロ・オブ・アドバンスト・オブ・オンコロジー、デ・ビーク、V. T.等、出版、J. B. リッピンコット、フィラデルフィア、42頁 (1980年) ; ゴールドガイバー、D. 等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (U. S. A.) 86巻、7606頁 (1989年) ; ヘラ、T.等、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、167巻、637頁 (1990年))。細胞増殖の阻害因子とは以下のものを含む：

1. インターロイキン-1 α (IL-1 α) (モンタサノ、R.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、99巻、1706頁 (1984年) ; モンタサノ、R.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、122巻、424頁 (1985年) ; マシアー、T.等、サイエンス、249巻、1570-1574頁 (1990年)) ;
2. 組織阻害因子 (フレイター-シュローダー、M.等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (U. S. A.)、84巻、5277頁 (1987年) ; サトウ、N.等、ジャーナル・オブ・ナショナル・キャンサー・インスティテュート、76巻、1113頁 (1986年) ; プパー、J. P.、アメリカン・ジャーナル・オブ・パソロジー、133巻、426頁 (1988年) ; シマダ、Y.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、142巻、31頁 (1990年)) ;
3. トランスフォーミング増殖因子 β (transforming growth factor- β) (ベ

レ、193-208頁 (1984年) ; スミス、J. R.等、イクスプレメンタル・ゲノミクス、24巻、377-381頁 (1989年)、本明細書に参照して組み込んである)。研究者らは、細胞老化に関連した遺伝子をクローン化することを試みている。DNA合成阻害因子 (an inhibitor of DNA synthesis) の存在と細胞老化現象の間の相関関係が示唆されている (スピアリング、A. I.等、イクスプレメンタル・セル・リサーチ、179巻、159-167頁 (1988年) ; ベレイラスミス、O. M.等、イクスプレメンタル・セル・リサーチ、160巻、297-306頁 (1985年) ; ドレッチャー-リンカーン、C. K.等、イクスプレメンタル・セル・リサーチ、153巻、208-217頁 (1984年) ; ドレッチャー-リンカーン、C. K.等、イクスプレメンタル・セル・リサーチ、144巻、455-462頁 (1983年))。更に、ある種の老化関連RNA分子の相対量 (relative abundance) が測定されている (ランキン、C. K.等、サイエンス、232巻、393-395頁 (1986年))。

いくつかの研究室では、“サブトラクション・ディフェレンシャル (subtraction-differential)” スクリーニング法を用いて、老化細胞中で優先的に存在するRNA種に由来するcDNA分子を同定している (クラインセック、D. A.、エイジ、12巻、55-60頁 (1989年) ; ジョルダノ、T.等、イクスプレメンタル・セル・リサーチ、185巻、399-406頁 (1989年) ; シェラ、F.等、モレキュラー・アンド・セル・バイオロジー、9巻、5610-5616頁 (1989年) ; ベレイラスミス、O. M.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、(付録 12部A)、193頁 (1988年) ; クラインセック、D. A.、スミス、J. R.、エイジ、10巻、125頁 (1987年))。

“サブトラクション・ディフェレンシャル (subtraction-differential)” スクリーニングと名付けられた1つの方法では、cDNA分子のプールを老化細胞から作成し、次いで、成長細胞のcDNAまたはRNAとハイブリダイズして、これらの成長細胞に存在する特徴的なcDNA分子を“排除 (subtract out)” する。“サブトラクション・ディフェレンシャル” 法は、ある目的のた

イルド、A.等、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、138巻、476頁 (1986年) ; ムリュー、G.等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (U. S. A.)、84巻、5600頁 (1987年) ; マイリ、J. A.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、106巻、1375頁 (1988年)) ;

4. ガンマインターフェロン (フリーセル、R.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、104巻、689頁 (1987年) ; ツルオカ、N.等、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、155巻、429頁 (1988年)) および
5. 組織プロモーター、ホルボールミリスチリン酸 (PMA) (モンタサノ、R.等、セル、42巻、469頁 (1985年) ; ドラトロー、S. R.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、104巻、679頁 (1987年) ; モンタサノ、R.等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、130巻、284頁 (1987年) ; ホシ、H.等、FASADジャーナル、2巻、2797頁 (1988年))。

老化を進行させ、かつ細胞の増殖能力を回復することへの期待は、多くの分野の努力活動にかかわっている。老化疾患の多くは、この能力の喪失に起因している。加速された加齢を特徴とする老年性疾患、早老症 (progeria) もまた、細胞の増殖能力の喪失に関連するものである。この能力の回復は、この疾患の、他の年齢関連疾患の、さらに加齢自身の治療に、広い範囲にわたるかわりを持つものである。

加えて、老化細胞の増殖能力の回復は、医薬および製薬工業において利用される。非形質転換細胞を不活化する能力を用いれば、ある種の細胞、さらには細胞生産物を制限に供給することも出来る。

従って、細胞老化の阻害性は、数年来、高く評価されてきた (スミス、J. R.、セル・エイジング、モノグラフ・イン・デベロップメンタル・バイオロジー ; ツァー、H. W. (出版)、S. カーガー、ニュー・ヨーク、N. Y.、17

めには有用であるけれども、老化関連cDNA分子が、老化の原因に関わっているのか、それとも老化の結果として生成したのかを決定できないという点がある。実際に、この方法で同定された配列の多くは、細胞外マトリックスのタンパク質をコードすることが見い出されている。そのようなタンパク質の発現における変化が、老化を引き起こすのではないようである。

発明の要約

本発明は、ある部分では、正常ヒト細胞がイン・ビトロで有限の増殖能力を示し、ある回数分裂した後、老化に突くという観察に開示する。細胞が老化すると、それらは、細胞の大きさの配大、細胞外マトリックス成分の変化、有糸分裂促進物質に対する不応答、および成長調節因子発現の機能減退のようないくつかの形態学的および生化学的変化を示す。

本発明は、老化細胞中に生成するDNA合成阻害因子を同定するものである。この阻害因子は、老化細胞の発現において重要な役割を果たす。阻害因子をコードする遺伝子は、老化細胞cDNAライブラリーを哺乳動物細胞ベクターに組み込むことにより同定した。次いで、該cDNAライブラリーを若い、サイクリング細胞 (cycling cell) 内にトランスフェクションし、DNA合成の開始を抑制するこれらのライブラリーの組成メンバーを同定した。

効率的DEAEデキストラン媒介トランスフェクションにより、3種の別々のcDNAクローンにおいて、老化細胞由来の阻害因子 (SDI) 配列と決定されるものの分離が出来た。1種 (SDI-1) の発現は細胞老化にして20倍増加したのに対し、他のもの (SDI-2とSDI-3) は一定を保った。

要するに、本発明は、機能的なアッセイ (assay) を用いて、DNA合成阻害因子のクローニングを達成するものである。この方法を用いて組織特異的分化および組織形成阻害因子のような、細胞周期の食の調節に関連する他の遺伝子をクローン化することも出来る。この方法を用いて、3種の阻害因子配列がクローン化されている。これらの配列の1つ (SDI-1) は、細胞老化と密接に関連しているようである。

詳細には、本発明は、受容細胞におけるDNA合成を阻害する能力を持つタン

バク質をコードする核酸分子を提供するものである。

本発明は、特に、核酸分子がDNAであって、そしてDNAプラスミド(p c DSR α Δなど)に組み込まれるものである、実施態様に開示している。

本発明は、上述の核酸分子がSDI-1であり、それが図5<配列番号1>で示された配列を有するものである、実施態様にも開示している。

本発明は、核酸分子がRNAである実施態様にも開示している。

本発明は、当該RNA分子に相補的な配列、および生理学的条件下で該分子をもう一方とハイブリダイズさせるに十分な長さを有する核酸分子(DNAまたはRNAのいずれか)にも開示する。

本発明は、また、当該細胞に、受容細胞(および特に胚性細胞またはイン・ビトロ培養での細胞)におけるDNA合成を阻害する能力を持つタンパク質をコードする上述の核酸分子の有効量を与えることを含んで成る、ヒト細胞におけるDNA合成を阻害する方法を与えるものである。

本発明は、当該細胞に、受容細胞におけるDNA合成を阻害する能力を持つタンパク質をコードするRNA分子に相補的な配列を持ち、かつ生理学的条件下でもう一方とハイブリダイズさせるに十分な長さを有する核酸分子(DNAまたはRNAのいずれか)の有効量を与えることを含んで成る、静止または変化ヒト細胞におけるDNA合成の阻害を抑制する方法を提供するものでもある。特に想定されるのは、細胞が皮肉細胞または樹状細胞または大腸細胞に存在する細胞である場合の実施態様である。本発明は、更にリンパ球、巨細胞(白血球、小腸球、毛細胞、脾臓など)、肝臓、腎臓、心臓および他の筋肉、骨、関節などの軟組織以外の細胞における本発明の高濃度の使用を意図するものである。

図面の簡単な説明

図1は、cDNAクローニングおよび発現ベクター、p c DSR α Δ(BはRsalI 1 部位を被す)の構造を示す。

図2は、若い細胞のDNA合成に対して阻害性のcDNAクローンを同定するものである。3本の異なる棒は、独立したトランスフェクション実験を表しており、*は、実施されなかったことを示し、白の数は、対照より高い増殖指数を示す。

エンシズ・USA、85巻、5112-5116頁(1988年))。老化細胞を特徴する抗原性決定因子が、顕形質膜上に見つかった(ポーター、M. B. 等、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、142巻、425-433頁(1990年))。フィブロネクチンおよびコラゲナーゼなどの細胞外マトリクスの成分が、老化細胞の中で過剰に発現されることが見い出された(ウエスト、M. D. 等、イクスプレメンタル・セル・リサーチ、184巻、138-147頁(1989年))。クマザキ、T. 等、イクスプレメンタル・セル・リサーチ、195巻、13-19頁(1991年))。しかしながら、これらの観察と細胞老化との関連性は明らかではない。

最近、幾つかの成長調節遺伝子の発現における変化が明らかにされた。c-fos、cdc2、サイクリンAおよびBの発現が老化細胞では減少することが見い出された(セサドリ、T. およびカンビシ、J.、サイエンス、247巻、205-209頁(1990年))。同様に、老化細胞は、細胞芽生タンパク質をリン酸化する能力がないことを明示している(ステイン、G. H. 等、サイエンス、249巻、666-669頁(1990年))。これらの観察は、これらが全て成長促進遺伝子発現の低下変化であることから、当該細胞がS期に入る能力の低いことを強力に説明し得ると思われるが、しかしながら、これらが老化の原因であるのか、結果であるのかは明らかではない。

老化を引き起こす役役を持つと思われる遺伝子発現におけるもう1つの付加的な変化は、若い胚性細胞ではなく、老化胚性細胞により生成されたDNA合成の阻害因子(群)である(スビタリング、A. J. 等、イクスプレメンタル・セル・リサーチ、105巻、511-545頁(1981年)参照)。阻害因子(群)が存在する証拠は、最初、ヘテロカリオン実験から得られ、その中で老化細胞は、ヘテロカリオンの中の若い細胞内でDNA合成の開始を阻害した(ノルウッド、T. H. 等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・USA、71巻、2231-2234頁(1974年))。ペレイラ・スミス、O. M.、およびスミス、J. R.、ソマティック・セル・ジェネティクス、8巻、731-742頁(1982年))。老化細胞質体と若い細胞全体を含む

す。

図3は、アンチセンスSDI cDNAトランスフェクションを示す。アンチセンスcDNA発現プラスミドを作り、若い細胞中にpCMV β と同時にトランスフェクションした。レーン1: 対照p c DSR α Δ、レーン2: p c DSR α Δ-SDI-1、レーン3: p c DSR α ΔアンチSDI-1、レーン4: p c DSR α Δ-SDI-2、レーン5: p c DSR α Δ-アンチSDI-2。

図4は、細胞増殖中の総RNAからのポリA+RNA回収における変化を示す。

図5は、SDI-1 cDNAのヌクレオチド配列とアミノ酸配列を与える。

発明の詳細な説明

I. 細胞老化

培養における、ヒト正常二倍体胚性細胞の複製的老化は、完全に既立され、かつ広く受け入れられている細胞増殖モデルである(ハイブリック、L. 等、イクスプレメンタル・セル・リサーチ、37巻、611-636頁(1965年))。ノルウッド、T. H.、およびスミス、J. R.、ハンドブック・オブ・ザ・バイオロジー・オブ・エイジング(第2版)、C. E. フィンチおよびE. L. シュナイダー、パン・ノストランド出版、ニューヨーク、290-311頁(1985年))。ゴールドシュタイン、S.、サイエンス、249巻、1129-1133頁(1990年))。有限細胞の集団増殖(population doublings)は、細胞が老化すると、それらは分裂したり大きくて平らな形態を喪失したりする能力を失う。この現象の基底にある原因となるメカニズムは、生化学レベルおよび分子レベルで老化細胞を特徴付ける多くの観察にも拘わらず、まだ理解されていない。

1次元および2次元タンパク質ゲル分析により、老化細胞に特異的なマーカータンパク質はほとんど無いことが明らかにされている(リンカーン、D. W. 等、イクスプレメンタル・セル・リサーチ、154巻、136-146頁(1984年))。ワング、E. 等、ジャーナル・オブ・セル・バイオロジー、100巻、545-551頁(1985年))。スコット、J. 等、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、131巻、210-217頁(1987年))。ペレイラ・スミス、O. M.、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイ

エブリッド(cybrids)の研究は、老化細胞中の、表面膜結合タンパク質のDNA合成阻害因子の存在に対して、異なる支持を与えるものであった(ドレシャー・リンカーン、C. K.、およびスミス、J. R.、イクスプレメンタル・セル・リサーチ、153巻、208-217頁(1984年))。このことは、老化細胞由来の表面膜結合物が良質な阻害物、またはその阻害から抽出したタンパク質を若い細胞の培養液に加えたとき、DNA合成を阻害することが見い出されることで直接証明された(ペレイラ・スミス、O. M. 等、イクスプレメンタル・セル・リサーチ、160巻、297-306頁(1985年))。ステイン、G. H.、およびアトキンス、L.、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・USA、83巻、9030-9034頁(1986年))。この阻害因子の生化学的方法による同定は、現在までのところ、成功していない。しかしながら、マイクロインジェクション実験では、DNA合成阻害性mRNAが非常に多く存在することが示されている(ランキン、C. K. 等、サイエンス、232巻、393-395頁(1986年))。

DNA合成阻害因子(群)をコードする遺伝子(群)のクローニングを試みるために、機能スクリーニング法(a functional screening procedure)が用いられた。この方法により、若いサイクリン細胞中に導入した場合にDNA合成阻害活性を示す3段のcDNAを分離および同定した。これらの分子は、“老化細胞由来阻害因子群”(“SDI”)として本明細書に引用している。

II. 細胞老化の阻害因子群のクローニング

本発明の発明に際し、老化ヒト二倍体胚性細胞中に存在するDNA合成阻害性配列の分子クローニングのために有効な方法が好適に用いられる。生物学的に重要な阻害因子群のクローニングを試みる場合そうであるように、その生物学的活性は容易に検出し得るのに、細胞老化にかかわる所望の阻害因子を精製するのは可能でないこともある。

このような阻害因子配列を同定するために、考え得る1つの方法は、老化細胞由来cDNAライブラリーのディファレンシャル(differential)またはサブトラクティブ(subtractive)スクリーニングを用いることであろう。この方法は、

ヴェルナー症候群由来の細胞において過剰発現されるcDNA分子を特定するに用いられている(ムラノ、S.等、モレキュラー・セル・バイオロジー、11巻、3905-3914頁(1991年8月))。ヴェルナー症候群は、常に遺伝する疾患である。それは早老加齢(premature aging)により特徴付けられている。自然の加齢とヴェルナー症候群との関連性は知られていない。

不変にも、このようなスクリーニングは、老化細胞の特定には限定されるけれども、老化の主要な原因ではない、多数の遺伝子を特定するだろう。更に、全長cDNAのクローニングにおける技術的な制約が、これらの方法によりクローン化される遺伝子群の機能決定を困難にしている。これらの理由から、このようなディファレンシャル法は、老化関連遺伝子配列群を特定するには、一般的に適切でもなく、また最も望ましい方法でもない。

反対に、発現スクリーニングは、このような老化関連遺伝子配列群の好ましい同定および分類方法を与えるものである。このスクリーニング法では、クローン化した遺伝子を受容細胞において発現する能力を有するベクター内でcDNAを直接クローン化する。こうして、DNA合成における何等かの阻害に対して直接受容細胞をスクリーニングすることが出来る。

発現スクリーニングにおいて、最も重要な段階は、cDNAの合成である。酵素は、変性物がないように、注意深く選択されるべきである。cDNA合成は、高効率の行く結果(即ち、正置な逆転写および十分な長さの転写サイズ)が得られることを確保するために、好ましくは数回繰り返される。最終的に、cDNA生成物は、好ましくは、断片になったり早すぎたりしたcDNA生成物を除去するために、サイズ画分される。二本鎖cDNA生成物は、次いで、大きさに基づく画分、即ち、0.5-2.0、2.0-4.5、4.5-10kb画分に好適に分けられる。低結合タンパク質の多くが、相対的に高い分子量を有するという推定のもとに、2-4.5kb cDNA画分を用いて、cDNAライブラリーを作成した。cDNA群は適切な発現ベクター、好ましくはpCDSR α の中に挿入され、挿入された配列群は若い細胞内で高レベルで転写される。

最も好ましいトランスフェクション法は、DEAEデキストラン媒介トランス

フェクションであり、高い割合で若いサイクリング細胞を一時的に発現させる条件下で行われる。トランスフェクション頻度は、実験毎に変化するため、cDNAプールのプラスミドと一般にトランスフェクションし、感染指数を β -ガラクトシダーゼ陽性細胞のみでアッセイした。一般に、トランスフェクションした遺伝子群の同時発現は、トランスフェクション・コンピテントな細胞が多くのプラスミドを受け入れることから、かなり高い。この簡単な同時トランスフェクション法は、細胞外DNAを発現する細胞におけるDNA合成の評価を可能にした。

同時トランスフェクションされるプラスミドは、パイロット試験から決定された。トランスフェクション頻度と加えたプラスミドの量との間の相互関係は、マーカープラスミドを用いて試験され、最大効率は、プラスミド100-500ngの範囲で得られる。この結果を考慮に入れて、好ましくはcDNAライブラリーを、各プールが5種の独立したプラスミドクローンを含む小さいプールに分けた。次いで、pCMV β 約100ngとcDNAプラスミド約400ngとで同時トランスフェクションを行う。これらのパラメーターは、マーカープラスミドのトランスフェクション頻度を低減することなく、 β -ガラクトシダーゼ陽性細胞におけるcDNAの同時発現を最大にすることが見出された。

スクリーニングの第2ラウンド後、DNA合成の効力な阻害を示した単一のプラスミドを、第1ラウンドスクリーニングの時に陽性と判断されたプールからうまく分離することが出来た(図2)。図2では、第1ラウンドスクリーニングにおいて陽性を示したcDNAプールの個々のプラスミドに分け、再びトランスフェクションした。各cDNAプール(A、BおよびC)について、プラスミドNo.1ないし5は、それぞれ単一プラスミドトランスフェクションの結果を示している。プールBでは、No.1プラスミドは、単なる空のベクターであることが分かった。プラスミドの阻害活性は、好ましくは、核ミクロインジェクション実験により、更に確かめられる。このような実験は、分離されたプラスミドがDNA合成を阻害する能力を持つ配列群を含むことの、より確率的な証拠を与えるものである。

III. 本発明の分子およびそれらの使用

本発明は、DNA合成を阻害するかまたは可能にするいずれかの様々な化学薬剤の使用を意図するものである。このような薬剤は：(1)オリゴヌクレオチド、(2)低阻害タンパク質、または(3)オリゴヌクレオチドまたは核酸結合分子のいずれかの構造によく似た構造の化合物(即ち、“ペプチドもどき”剤)であり得る。

本発明の薬剤は、活性細胞におけるDNA合成の阻害を誘導するか、または老化または静止細胞における、このような阻害を抑制するかのいずれかの能力を持つものであり、それらは、広範囲の治療および応用に用いられ得る。

従って、1つの実施形態では、本発明は、受容細胞におけるDNA合成を阻害する能力を有するcDNA分子を、機能的な(即ち、発現可能な)形で分離する方法を与えるものである。このような“SDI”核酸分子、同じくそれらがコードするタンパク質、およびそれらのペプチドもどき類似体は、受容細胞における老化または静止状態の誘導時に、用いる。このような誘導は、早老症(バグム、A. J.、アーカイブス・オブ・デルマトロジー、125巻、540頁(1989年))；ハーマー、L.等、オルソペディックス、11巻、763頁(1988年)；マーチン、G. M.、ナショナル・キャンサー・インスティテュート・モノグラフ、60巻、241頁(1982年)；年齢関連疾患(マーチン、G. M.、ゲノム、31巻、390頁(1989年))；ロー、D. A.、クリニカル・ゲリアトリックス・メディスン、8巻、311頁(1990年)；ムラディアン、A. D.、ジャーナル・オブ・アメリカン・ゲリアトリックス・ソサエティ、36巻、831頁(1988年)；アルパート、J. S.、アメリカン・ジャーナル・オブ・カルディオロジー、65巻、231頁(1990年)；アルツハイマー病(チリー、R. D.、モノグラフ・オブ・パソロジー、32巻、41頁(1990年))；コスター、B.等、フーマコサカイアトリ、23巻、85頁(1990年)；脳力症およびカヘネー(ヴェルナー、R. B.、ゲリアトリックス、45巻、26頁(1990年))、または迅速な細胞増殖が望ましくないような疾患または症状の処置に、望ましい。この関係で、本発明の薬剤を治療的に用いて、類似ま

たは悪化細胞の過剰な増殖を抑制することが出来る。従って、本発明は、症を治療するための治療を提供するものである。

SDI核酸分子の配列は、静止および老化に関連するDNA合成の阻害を抑制するのに用いられ得るタンパク質分子を解明および同定することを可能にする。このような分子のアミノ酸配列は、核酸分子のヌクレオチド配列とそれがコードするタンパク質のアミノ酸配列との間の知られている関係から容易に導き出すことが出来る。本発明は、明らかにされたSDI核酸分子の転写および翻訳により合成されるタンパク質およびペプチド分子を包含している。

本発明により包圍されている付加的な類似分子は、SDI配列から発現されるタンパク質の機能とよく似たタンパク質または他の分子(即ち、ペプチドもどき類似体)を含んで成る。

これらおよび他の類似体は、例えば、本発明の試薬のDNA合成を阻害または発現阻害する能力を活用することにより容易に同定され得、これらの工程を逆にすることが出来る薬剤を同定することにも用いられる。故に、例えば、細胞をSDIオリゴヌクレオチドと類似アンタゴニスト化合物のいずれかが存在する中でインキュベートすることもある。その細胞を追跡して、化合物がDNA合成を阻害するSDIオリゴヌクレオチドの能力を低減出来るかどうかを測定するのである。従って、本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチドのアンタゴニストを同定することが出来る“スクリーニングアッセイ”を包含する。逆に言えば、細胞をSDIアンチセンスオリゴヌクレオチドと類似アンタゴニスト化合物のいずれかが存在する中でインキュベートすることもある。細胞を追跡して、その化合物がDNA合成を抑制解除するアンチセンスオリゴヌクレオチドの能力を低減出来るかどうかを測定するのである。従って、本発明は、アンチセンスオリゴヌクレオチドのアンタゴニストを同定することが出来る“スクリーニングアッセイ”を包含する。同様の方法で、これらの薬剤のアゴニストを代替的に同定することも可能である。

このようなスクリーニングアッセイの使用により同定されるアゴニスト化合物の中には、不妊を引き起こすために使用してもよい化合物がある。同様に、こ

のアクセシビリティは、組織再生または血管新生を抑制するかまたは引き起こすいずれかの能力を持つ化合物の同定を可能にするであろう。このような化合物は、癌の処置に有用であり得る。

タンパク質およびポリペプチドの発現時および望ましい類似体の定量的付時にそれらを使用するのに加えて、本発明のSDI核酸分子は、SDI核酸分子に結合し、その活性を阻害するなどの能力を持つアンチセンス核酸分子を生成するのに用いることができる。特に好ましいのは、このような薬剤がアンチセンスオリゴヌクレオチドである場合である。

一般に、“アンチセンスオリゴヌクレオチド”は、その配列がターゲットのmRNA分子（またはそれに対応する遺伝子）の配列に相補的である核酸（DNAまたはRNAのいずれか）であり、mRNA分子（または遺伝子）に結合するか、またはハイブリダイズし、それによって、mRNA分子の遺伝子産物への翻訳を阻害（即ち、弱めたり、妨げたりする）能力を持つものである。アンチセンスオリゴヌクレオチドとして働くには、核酸分子はターゲットmRNAの翻訳を媒介するターゲットmRNA分子（または遺伝子）の部分と結合するか、またはハイブリダイズする能力を持たなければならない。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヨーロッパ特許公開番号263,740; 335,451; および329,882と、PCT公開番号WO90/00524に開示されており、これらはすべて、本明細書に参照として組み込まれている。

本発明は、特に、SDI遺伝子産物をコードするmRNAまたはcDNA分子に結合するか、またはハイブリダイズする能力を持つようなアンチセンスオリゴヌクレオチドに関する。

従って、本発明の一態様では、SDI mRNA転写物の翻訳を特異的に遮断するようにデザインされたアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、受容老化細胞におけるDNA合成の阻害を抑制解除することが出来る。

アンチ-SDIアンチセンスオリゴヌクレオチドがこれらの目的を達成し得るような1つの方法は、SDI mRNAの翻訳開始領域の配列で、しかもSDI遺伝子のmRNA転写物にハイブリダイズ出来るのに十分な長さの配列に相補的

な配列を持つことによるものである。このようなオリゴマーの大きさは、この目的に効果的な任意の長さであることが出来る。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約10-30ヌクレオチドの長さであり、最も好ましくは、約15-24ヌクレオチドの長さであるだろう。

代替法として、短くして、生理学的、イン・ビオ条件下で、SDI mRNAに安定にハイブリダイズ出来ない長さのアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることもある。このようなオリゴヌクレオチドは、且次にして約6-10またはそれ以上のヌクレオチドであることもある。本発明に従って用いられるためには、このようなオリゴヌクレオチドは、好ましくはSDIコード化mRNAの翻訳開始領域に結合させるように修飾されている。このような修飾分子の例には、抗体（または抗体フラグメント）に結合させたオリゴヌクレオチド、または一本鎖SDI mRNA分子に結合出来る他のリガンド（例えば、トリメチルソラリン、8-メトキシソラリンなどの、二価架橋剤など）がある。

二価架橋剤（ソラリン、例えば、トリメチルソラリンまたは8-メトキシソラリン）付加物の1つの反応基に結合させたアンチ-SDIアンチセンスオリゴヌクレオチドは、350-420nm UV光で活性化してSDI mRNAに架橋する能力を持つであろう。従って、このような光強度を調節する（UVランプのワット数を変える、細胞とランプの間の距離を広げる等による）ことにより、アンチセンスオリゴヌクレオチドと細胞のSDI mRNAとの間の結合程度をコントロールする場合もある。これにより、局所、受容細胞におけるSDI遺伝子発現の低減の程度をコントロールすることもまた可能になる。

一般に、アンチセンスオリゴマーは、SDI遺伝子のヌクレオチド配列に従って複製され、最も好ましくは、SDI-1のヌクレオチド配列（図5）に従って複製される。

アンチセンスオリゴヌクレオチドの配列は、生成するオリゴヌクレオチドが、上記したSDI mRNA、cDNAまたはSDI遺伝子向きのいずれかの上記翻訳産物に結合するかまたはハイブリダイズする能力を持つことを前提として、1つまたはそれ以上の部分に、1つまたはそれ以上のヌクレオチドの挿入、置換、

で失をのみ得る。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを合成するには、当業者に知られているどの方法も用い得る（ザメチク等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（U. S. A. ）、83巻、4143頁（1986年）；グッドチャイルド等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（U. S. A. ）、85巻、5507頁（1988年）；ウィックストロム等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（U. S. A. ）、85巻、1028頁、ホルト、J. T. 等、モレキュラー・セル・オブ・バイオロジー、8巻、963頁（1988年）；ゲルウィルク、A. M. 等、サイエンス、242巻、1303頁（1988年）；アンフォッシ、G. 等、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス（U. S. A. ）、86巻、3379頁（1989年）；ベッカー、D. 等、EMBOジャーナル、8巻、3679頁（1989年）；引用はすべて、参照として本明細書に組み込まれている）。自効的融合産物をこの目的のために用い得る。加えて、いかなる配列の所望のヌクレオチドも、カスタムヌクレオチド分子の調製的供給業者から入手出来る。

最も好ましくは、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは図相“ホスホアミダイト合成”を用いて複製してもよい。該合成は、オリゴヌクレオチドの3'-ヒドロキシル末端になるヌクレオチドで誘導された固体支持体に結合させた伸長ヌクレオチドを用いて行われる。該方法は、その5'-ヒドロキシル基が（好ましくは、5'-DMT（ジメトキシトリチル）基で）保護されており、そのアミノ基がベンゾイル基（シトシンおよびアデノシンのアミノ基のため）またはイソブチリル基（グアノシンを保護するため）のいずれかで保護されているモノマー単位を用いるDNAの固相合成を含む。このような誘導体の製造方法は、当業者には、よく知られている。

本発明のアンチセンスおよび他の阻害剤は、さもなければ一時的な増殖性生存能力しかもたない停滞する細胞型（一次組織培養細胞等）に永続性を与えるために用い得る。従って、これらは、胚芽または組織培養細胞または移植細胞に関して、

研究のために、多数の細胞の蓄積を可能、もしくは助長したりするのに用い得る。それ故に、一実施態様では、本発明の薬剤を胚芽または組織培養方法と共に用いて、当該方法を促進させることもある。

使用することにより生理学的条件が変わるのであれば、その使用は局所的と告われている。非治療的用途というのは、使用者の外観を変えるものである。

本発明の薬剤は、例えば皮膚の調子、色、質感等、またはリンパ管、血管（動脈、小動脈、毛細血管、静脈など）、肝臓、腎臓、心臓および他の筋肉、骨、脾臓などの組織、組織または器官の再生における、加齢の効果を助けることなどの治療または非治療目的のために局所的に、または組織的に用い得る。本発明の薬剤は、そのような細胞、組織または器官を若返らせるのに用い得る。従って、これらは、胚芽等に用いることが出来、それらの胚芽等は例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはそれと同等の物、および好ましくは、適切な溶媒に溶解させた脂質親和性キャリアーまたは添加物を含んで成るものであり得る。このような塩は、例えば、水-エタノール混合物（10%ないし30%v/vまたはもっと多くのエタノールを含む）であってもよい。このような製剤は、0.01%ないし1.0%のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有し得る。適切なキャリアー、添加剤および溶媒は、レミントン・ファーマシューティカル・サイエンス（第15版、オソル、A. 出版、マック、イーストン・ペンシルバニア（1980年））、この文獻は、本明細書に参考として組み込まれている）に記載されている。

本発明のアンチセンスおよび他の阻害剤分子が細胞増殖を阻害する能力を有することから、それらを用いて、火傷、または外科手術後の損傷治癒、回復を促進したり、萎縮した組織等を修復したりすることも可能である。このような実験態様のために、これらの薬剤は、抗生物質、抗菌剤などと共に、局所投与または全身投与に用い得られることもある。

このような本発明のアンチセンスおよび他の阻害剤分子は、ヒトまたは動物における胚芽細胞の増殖または卵母細胞の成熟を助成するのに用い得る。従って、本発明の薬剤は、受容者の受精能力を増進するために使用され得る。

本発明の分子は、受容者に遺伝子治療を施すために用いても良い。一実施態様では、患者由来の細胞または組織を患者から除去し、活発な成長状態を回復させるのに十分な条件下、本発明の分子で処理する。この使用の好ましい態様では、個人（例えば、エイズ患者など）のように免疫抑制した個人（immune compromised individual）または、リンパ球の提供者として働く、免疫能力の十分な個人（immune-competent individual）などのリンパ球を破壊し、アンチセンス S D I 核酸で阻害することが出来る。これらの分子の投与は、リンパ球を抑制解除するであろう。投与後、リンパ球は患者に再び導入され、感染と戦う能力が増強される。

本発明の分子は、特に、疾病または組織再生のための動物モデルの創製および/または研究に使用するために用いている。従って、本発明の分子を用いて、異常な細胞または組織再生により特徴付けられる動物モデルのエフェクター（effector）を研究することが出来る。同様に、S D I 分子（例えば、適切な調節配列と連結させて、受容細胞におけるそれらの発現を可能にさせたもの）を投与して、加齢および組織再生の動物モデルを創製するのに用いても良い。

セル膜、またはマイクロエマルジョン中に封じ込む（encapsulate）ことが可能である。このような技術は、レミントンズ・ファーマシューティカル・サイエンシズ（1980年）に開示されている。

本発明の組成物は、注射、迅速な点滴、鼻咽吸収（鼻咽管内）、皮膚吸収による経口の投与または経口投与用に製剤化されることも出来る。これに代えて、該組成物を筋肉内投与または静脈内投与してもよい。経口投与のための組成物は、滅菌水溶液または非水溶液、懸濁液、および乳液を含んでいる。非水性懸濁液の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステル類である。固体、添加剤または阻害剤を用いて、組織浸透性を増大させたり、吸収を促進させたり出来る。経口投与のための液体投与形態は、一般にこの液体投与形態を含有するリポソーム溶液を含んで成ることもある。膜状リポソームに適切な形態は、乳液、懸濁液、溶液、シロップ、およびエリキシルを含み、当該分野で通常用いられる製剤水などの不活性希釈剤を含む。不活性希釈剤の他にも、このような組成物は、増強剤、乳化剤および安定剤または甘味料、香味料、着色料、または防腐剤も含み得る。

組成物は、その投与に受容者が耐え得る場合、「医的に許容される」と言われる。投与される量が生理学的に有意である場合、そのような組成物は、「治療的に有効」として投与されると言われる。組成物は、その存在が、結果として受容者の生理機能における検出可能な変化を生じる場合、生理学的に有意である。

一般に、有効量の組成物を与えるために必要とされる投与量は、受容者の年齢、体重、性別、および病状の程度、あるとしても当該分野の通常の技術者により調整される他の変化、などの要因に依存して変化する。

本発明の組成物の有効量は、用量または適用当たり0.01-1.000mg/kgで変化するが、より少なくまたはより多く用いても良い。

以上、本発明を一般的に記述してきたが、以下の実施例を参考にするにより、より容易に理解されるであろう。それらの実施例は、特記したものを除き、

IV. 投与方法

本発明の組成物は、医的に有用な組成物を調製する知られた方法に従って製剤化でき、該方法により、これらの材料、またはそれらの機能的誘導体が医的に許容されるキャリアー媒体と組み合わせて混合物とされる。適切な媒体および他のヒトタンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンを含む、それらの製剤は、例えば、レミントンズ・ファーマシューティカル・サイエンシズ（第16版、オックス、A. 出版、マック、イーストン、ペンシルベニア（1980年））に記載されている。効果的な投与に適切な医的に許容される組成物を形成させるためには、当該組成物は、有効量のアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはその均等物、またはそれらの機能的誘導体を適量のキャリアー媒体と共に含有するであろう。

異なる製剤方法を用いて、作用の持続期間を制御し得る。アンチセンスオリゴヌクレオチド、またはその均等物、またはそれらの機能的誘導体を複合（complex）または包摂するポリマーを用いることにより、放出制御剤を完成できる。放出制御剤のために、適切な高分子（例えば、ポリエチレン、ポリビニル、ポリピロリドン、エチレンビニルアセテート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、またはプロタミン、サルフェート）と高分子の密度、同じ（組み込み方法を選択することによって、制御された放出を實行できる。制御放出剤により、作用持続期間を制御するもう一つの可能な方法は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、またはその均等物、またはそれらの機能的誘導体を、ポリエチレン、ポリビニル、ポリピロリドン、ポリ（乳酸）またはエチレンビニルアセテートコポリマーなどのポリマー物質の粒子に組み込むことである。代替法として、これらの組成物をポリマー粒子に組み込む代わりに、これらの組成物、例えば、コアセルベーション技術、または、界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルそれぞれの中に、またはコロイド状微粒子放出システム、例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、ミクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプ

セルを示すために提供したものであり、本発明の限定を意図するものではない。

実施例1

cDNAライブラリーの創製

cDNAライブラリーは、細胞系HCA2などの正常ヒト新生児包皮組織芽細胞由来のRNAを用いて得られた。これを行うためには、細胞を、10%胎児ウシ血清（GIBCOまたはハイクロン）を含有した、均等のとれたフル培養液またはハンクス培養液のいずれかを含む最小必須成分培地で培養させた。細胞を培養し、それらのイン・ビトロでの育命を、以下参考として組み込んであるスミス、J. R.、およびブラウンシュバイザル、K. I.、ジャーナル・オブ・セル・フィジオロジー、98巻、597-601頁（1979年）に記載されている条件下で測定した。静止細胞は、細胞が致密的（confluent）になる前に、正常培養培地を、0.5%血清を含む培養培地に変えることにより作成された。該細胞は、低血清培地で3週間まで維持された。

全細胞RNAをグアニジウムチオシアネート/CsCl法（ガルガー、S. J.、バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ、117巻、835-842頁（1983年））か、またはグアニジウムチオシアネート/フェノール法（コムジンスキー、P. およびチャック、N.、アナリティカル・バイオケミストリー、162巻、156-159頁（1987年））、RNAソルベ、バイオテックス・ラボラトリー・インコーポレイテッド、テキサス）のいずれかにより分離した。ポリA+RNAはオリゴ（dT）セルロースカラムクロマトグラフィー（コラポレイティブ・リサーチ、マサチューセッツ）により分離した。

上記したように、老化細胞から得られたポリA+RNA 10μgは、標的（BRIL, MAD）の感染に従いRNアーゼH⁺/MMLV逆転写酵素を用いることにより、二本鎖cDNA群に転換させ、T4ポリメラーゼ処理により平末端にした。二本鎖cDNA四重体群は、アガロースゲル電気泳動によりサイズ区分され、制限ベクターに挿入するために、2-4.5kbの部分を分離した。

この目的に用いられる制限ベクターは、3.4kbプラスミドであり、p c DS

R α と称されるものである(図1)。プラスミドpCDSR α は、プラスミドpCDSR α 296の誘導体であり、オカヤマ・バーグSV40プロモーターとHTLV-1由来のLTRを含む(タケベ、Y.等、モレキュラー・セル・バイオロジー、8巻、466-472頁(1988年)；M.ヨシダ博士(ケンソー・インスティテュート・オブ・ジャパン)により提供された)。プラスミドpCDSR α は、pCDSR296からPst I-Kpn Iフラグメントの336塩基対(bp)セグメントを除き、それをpUC19由来のPst I-Kpn Iフラグメントの28塩基対に置き換えることにより形成された。生じたプラスミド(pCDSR α)は、クロニングベクターおよび発現ベクターとして用いられた。

プラスミドpSV2cat(ゴーマン、C.等、モレキュラー・セル・バイオロジー、2巻、1044-1051頁(1982年))は、グレッグ・ターリントン博士(テキサス・チルドレン・ホスピタル)により与えられた。pCDベクター(オカヤマ、H.およびバーグ、P.、モレキュラー・セル・バイオロジー、3巻、280-289頁(1983年))は、H.オカヤマ博士(日本、大阪大学)により与えられたもので、該プラスミドは、SV40プロモーターとSV40ポリAシグナルの間に挿入されたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ("CAT")遺伝子を有する。pCDSR α -catは、Hind III-Sma I消化SR α プロモーターフラグメントの0.8kbをHind III消化pSV0catに、2段階の連結反応を経て、挿入することにより、pCDSR α から構築された。cDNAライブラリーの効率的な発現スクリーニングを可能にするためには、非常に強力なプロモーターが買われていた。数種の哺乳類発現ベクター(若い細胞内にトランスフェクションされたpSV2cat、pD-catおよびpCDSR α -cat)の分析から、SR α プロモーターが若いサイクリング細胞におけるCAT遺伝子の発現を高効率で促進することが見出された。これらのプラスミドの相対的なCAT活性は、各反応に用いられるタンパク質量に対して標準化することにより、計算された。転写効率は、SV40初期遺伝子プロモーターを利用する従来のpSV2プロモーターよりも約20倍高かった。

オケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション、117巻、835-842頁(1983年))に1回または2回かけて処理し、続いて、TE(10mMトリスpH8.0、1mMEDTA)溶液に対して過剰した。

実施例2

DEAE-デキストラン媒介トランスフェクションおよび効率的スクリーニング

若い、サイクリング繊維芽細胞(cycling fibroblast cells)を、トランスフェクション前18時間に、ウェル当たり0.9-1.2 $\times 10^4$ の密度で6ウェル組織培養プレートまたは35mm組織培養皿に接種した。トランスフェクションは、以下に記載のように数倍希釈した本明細書に説明として組み込まれているクレン、B. R.、ガイド・トップ・モレキュラー・クロニング・テクノロジー・メソッド・イン・エンザイモロジー、S. L.ベルガーおよびA. R.キメル出版、アカデミック・プレス、684-704頁(1987年)に記載されているように行われた。

各トランスフェクションのために、pCMV β 100ngとcDNAプール400ngを混合し、ホスフェート緩衝液(10mM)pH7.5に溶解し、10 μ lのDEAE-デキストラン(ファルマン、分子重500,000)10 μ lを加えた。クロニングベクタープラスミド、pCDSR α の400ngを対照として、pCMV β と共に用いた。細胞をPBSで1度洗浄した後、DNA溶液を加え、細胞をCO $_2$ インキュベーター内で37 $^{\circ}$ Cで45分間までインキュベートした。次いで、64 μ lクロロキン(シグマ、ミズーリ)を含む血清入り細胞培養液の2 μ lを直接加え、更に2.5時間インキュベートした。クロロキン処理後、トランスフェクション混合物を除き、細胞を血清入り細胞培養液中10%ジメチルスルホキシドで、2分間処理した。細胞をその後、血清入りの新しい細胞培養地に戻し、インキュベートして、トランスフェクションしたDNAを発現させた。

トランスフェクション後18時間で、 3 H-チロシン0.5 μ Ci/mlを加え、更に18時間インキュベーションを続けた。2.5%グルタルアルデヒド溶液2.5

た。

pCMV β は、ヒトサイトメガロウイルス初期遺伝子(immediate early gene)プロモーターにより駆動されるE. コリ β -ガラクトシダーゼ遺伝子を誘導している(マックグレゴール、G. R.およびキャスレイ、C. T.、ヌクレイック・アシッド・リサーチ、17巻、2365頁(1989年)；テキサス・ペイラー・カレン・オブ・メディシン、グラント・マックグレゴール博士により提供された)。プラスミドp β 440は、ヒト β -アクリン配列の443bpを誘導している(ナカジマ・イリマ、S.等、ブローディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス、82巻、6133-6137頁(1985年)；日本、大阪大学、コーゾー・マキノ博士により提供された)。プラスミドpHcGAP(ツァ、J. Y.等、ヌクレイック・アシッド・リサーチ、13巻、2485-2502(1985年))は、ヒトのグリセルアルデヒド3ホスフェートデヒドロゲナーゼ(GAPDH)cDNAの全長を運ぶものであり、メリーランド、ロックビル、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから得られた。

cDNAアンチセンス発現のため、cDNAフラグメントの全長をBamHI消化により、当初クロン化したpCDSR α ベクターから挿出し、逆向きに、逆接させた。

アガロースゲルから回収したcDNA群を直接、予備アルカリホスファターゼ処理したpCDSR α のSma I部位に挿入し、E. コリMC1061またはDH-1に形質転換した。アンピシリン耐性コロニーを無作為に釣り、プラスミドの大きさを測定した。これらの手順は、2-4.5kb cDNAの挿入が、試験されたプラスミドの90パーセント以上で起こるようになるまで繰り返された。次いで、各E. コリのコロニーをつまみ分け釣り、5コロニーを集めて1つのcDNAプールにした。100以上のcDNAプールの複製し、96ウェルのマイクロタイタープレート内で生育させ、14%グリセロール中に-70 $^{\circ}$ Cで保存した。DNA分画のために、各DNAプール由来のE. コリを200 μ l中に増殖し、標準的なエチジウムブロマイド/CsCl密度分離(ガルガー、S. J.等、バイ

olを培養培地に加えることにより、細胞を固定し、室温で5分間インキュベートし、続いて、PBSで3回洗浄した。洗浄後、直ちに、細胞をX-gal反応混合物(10mM KClを含有する0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)に溶解した10mM KCl、3mM [Fe(CN) $_6$] $^{3-}$ 、3mM [Fe(CN) $_6$] $^{4-}$ 、0.1%トリトンX-100、および1mM X-gal)で、20分間まで処理し、細胞を明青色に染色させた。X-gal染色後、細胞を水で洗浄し、乾燥して、コダック NTB 5350エマルジョン(Kodak NTB nuclear track emulsion)(コダック、ニューヨーク)を用いるオートラジオグラフィにかけた。次いで、X-gal陽性細胞におけるDNA合成活性を測定した。DNA合成の阻害パーセントは、式

$$\frac{\text{対照プラスミドをトランスフェクションした青色細胞中の標識率\%}}{\text{cDNAプラスミドをトランスフェクションした青色細胞中の標識率\%}} \times 100$$

を用いて計算された。

候補となるcDNAプールを個々のcDNA群に分け、特定のDNA合成阻害cDNA配列群を特定するために、更にスクリーニングにかけた。

若いサイクリング細胞の核マイクロインジェクションは、(ランペン、C. K.等、モレキュラー・セル・バイオロジー、6巻、2990-2993頁(1986年)、参照として本明細書に組み込まれている)に記載されているように行われた。要約すれば、5,000-10,000細胞を35mm組織培養皿の22 μ m四方のエッチングした格子状カバーガラス(square etched grid coverslips)(ベルコ)上にプレートした。3日または4日後、核マイクロインジェクションを、pCMV β +cDNAプラスミドまたはpCMV β +pCDSR α (対照として働く)のいずれかを用いて、最小300細胞について行われた。プラスミドをそれぞれ0ng/mlの濃度で同時マイクロインジェクションした。マイクロイ

インジェクション後18時間で、細胞を³H-チミンで24時間標識し、固定し、X-rayで染色し、オートラジオグラフィにかけた。DNA合成の阻害パーセントは、上記のように計算した。

総RNAのうち5μgまたはポリA+RNA 1μgのいずれかを用いて、ノーザンブロット分析を行った。総RNAは、ホルムアルデヒド-アガロースゲル上の電気泳動によりサイズ画分され、本明細書に参照として組み込んであるマニアチス、T.等、モレキュラー・クロニング: ア・ラボラトリー・マニアル: コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク (1982年) に記載されているように、ナイロン膜 (ICN; バイオトランス、前のポール・バイオダイナ) に移された。放射性活性プローブをランダム・プライマー法により調製し、ブロットは、マニアチス、T.等、モレキュラー・クロニング: ア・ラボラトリー・マニアル: コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク (1982年) に記載されているように、ハイブリダイズした。

ノーザンブロット分析により、SDIの細胞転写物の大きさはSDI cDNAの大きさに矛盾していないということが明らかにした。このことは、首尾よく複製スクリーニングを行うには、全长cDNAをベクターへ挿入する必要があることから、予想されるものであった。

β-アクトニンまたはグリセルアルデヒドホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH) プローブとの再ハイブリダイゼーションのために、使用説明書に従って、フィルターを陽性プローブから繰り返し洗った。そのデータは、アンビス・ラジオアナリティック・システム (Ambs Radianalytic Scanning System) により正数に計られた。

CAT活性のアッセイは、以下のように測定された:

若いサイクリング細胞を35mm皿に接種し、上記のようにプラスミド500ngをトランスフェクションした。トランスフェクション後24時間で、細胞を皿からこすり集め、CATアッセイをゴーマン (ゴーマン、C.)、DNAクロニング、ア・プラクティカル・アプローチ、IRL出版、オックスフォード、イギリス、

143-164頁 (1985年)、本明細書に参考として組み込んである) により記載されているようにして行った。

実施例3

老化細胞由来のDNA合成阻害因子群 (SDI) のcDNAクローニング

二本鎖cDNA群は老化細胞由来ポリA+RNAから合成され、若い細胞において細胞質にマイクロインジェクションした場合、DNA合成を阻害することが示されている (ランペン、C. K.等、サイエンス、232巻、393-395頁 (1986年))。このcDNA群は、サイズ画分され、pCDSRαΔに挿入された。生じたE. コリ クローンは、小プール群に分けた。高効率トランスフェクションにおいてさえ、実験室に頻度が変わるため、各プール由来のプラスミドをトランスフェクションマーカープラスミド、pCMVβと共に、同時トランスフェクションし、これにより、特定のトランスフェクション細胞の標識指数の測定が可能になった。マーカープラスミドのトランスフェクション頻度は、30-90%の範囲であった。約200のcDNAプールをスクリーニングし、5回トランスフェクションを繰り返した後、4プールがDNA合成阻害活性に対して陽性のままであった。陰性となるプール群は、次いで、個々のプラスミドに分け、更にスクリーニングした。

3つの別個の陽性プラスミドクローンが得られた。cDNAプールAでは、1つのプラスミド、2個のみが、強力なDNA合成阻害活性を示した。同様に、プールBおよびCでは、1つのcDNAクローンのみが阻害を引き起こした。挿入されたcDNAの大きさは、それぞれ2.1kb、1.2kbおよび2.7kbであった。これらのcDNA配列は、老化細胞由来の阻害因子として、それぞれSDI-1、SDI-2、SDI-3と呼称されている。

SDI-1 cDNAクローン (配列番号1) のヌクレオチド配列、およびSDI-1のアミノ酸配列 (配列番号2) が、決定されている。SDI-1について本明細書に基いたcDNA配列は、U. S. 特許出願番号07/808,523に記載されているものとは、285位に列挙されていないGを有する点、および1843-1844位の配列がGCではなくCGである点で異なっている。今回開示した配

列は、その分譲と特許がU. S. 特許出願番号07/808,523に記載されているpCDSRαΔ-SDI-1プラスミドの再配列化により、得られたものである。pCDSRαΔ-SDI-1プラスミドで影響を及ぼされたE. コリ DH5は、1992年10月1日、アメリカ合衆国、メリーランド、ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託されており、受託番号ATCC 69081が与えられている。

実施例4

若いサイクリング細胞へのSDI配列計マイクロインジェクション

SDI配列群の阻害活性を立証するために、マイクロインジェクションを行った。SDI-1またはSDI-2のいずれかを構築したプラスミドをマーカープラスミドと共に、若いサイクリング細胞の核内へ同時マイクロインジェクションした。生じた陽性細胞の標識指数を測定した (表1)。これらのプラスミドは、若い細胞のDNA合成に強力な阻害活性を示した。対照実験のために、空のベクターを、マーカープラスミドと共に、同時マイクロインジェクションした。これは、標識指数を非インジェクション細胞と比べた場合、わずかに阻害を引き起こしており、トランスフェクション実験では観察される現象でもある。SDI-3のマイクロインジェクションは、阻害活性がSDI-1およびSDI-2トランスフェクション実験よりも低かったため、行わなかった。

表1: 陽性プラスミドの若いサイクリング細胞へのマイクロインジェクション

インジェクションされたプラスミド	インジェクションされた細胞の数	陽性細胞の数 (個)	陽性率 (%)
実験1			
pCMVβ	335	53/97	59.8
+ pCDSRαΔ†			0
pCMVβ	380	20/89	22.5
+ SDI-1			62.4
pCMVβ	380	6/82	7.3
+ SDI-2			87.8
実験2			
pCMVβ	423	68/109	62.3
+ pCDSRαΔ†			0
pCMVβ	465	26/98	26.5
+ SDI-1			57.5
pCMVβ	475	27/118	22.9
+ SDI-2			63.2

†対照

* これは、最も可能なレベルのβ-ガラクトシダーゼを産生する細胞の数である。各DNAの濃度は、50ng/μlであった。

実施例5

アンチセンスDNAトランスフェクション

阻害活性が配列指向的であるかどうかを試験するために、SDI-1およびSDI-2配列のアンチセンス発現ベクターを相座した。いずれの配列もBspHI部位を欠いていたこと、また、BspHI部位は、cDNAの両方の末端に存在した(図1)ことから、これらの配列は、容易に抽出され、反対方向に再導入された。アンチセンス配列のトランスフェクションは、結果的に若い細胞におけるDNA合成を阻害しなかった(図3)。加えて、何等増大も観察されなかった。その結果は、明らかに、SDI活性の配列指向性を示しており、また、cDNA配列群によりコードされる特異的遺伝子産物の存在を示唆している。

実施例6

細胞老化中のSDI mRNAの発現

細胞老化中のSDI mRNA発現における変化を調べるために、若い細胞および老化細胞由来の総RNAを32P-標識SDI cDNAプローブとハイブリダイズさせた。このSDI-1プローブは、2.1 kb断片とハイブリダイズし、SDI-2は1.4 kb断片とハイブリダイズし、SDI-3は2.5 kb断片とハイブリダイズした(表2)。表2は、若い細胞(Y)と老化細胞(S)におけるSDI遺伝子発現の総RNAノーザン分析値を与えるものである。若い細胞および老化細胞由来の総RNAの各1μgをSDIプローブとハイブリダイズさせた。フィルターは、繰り返し、放射性活性プローブから洗脱し、内部対照としてプローブと再ハイブリダイズさせた。各試料におけるSDI mRNAの相対量は、同じフィルター上に検出されるGAPDH量と、SDI/GAPDHの相対値により標準化された。

表3: ノーザン分析の定量的値						
区画	SDI-1		SDI-2		SDI-3	
	Y	S	Y	S	Y	S
GAPDHの相対量	1.0	0.83	1.0	0.87	1.0	0.87
SDI/GAPDHの相対量	1.0	11.4	1.0	1.0	1.0	1.0

その結果は、明らかに、β-アクトリンとGAPDHの両方の発現は、それらをmRNAに基づき比較した場合、以前の観察に一致して、若い細胞と老化細胞とで等しいことを示した。SDI遺伝子発現をmRNAレベルで比較した場合、SDI-1 mRNAは、老化細胞では11倍増加し、それに対し、SDI-2およびSDI-3の発現は、イン・ビトロでの寿命を過ぎて一定に保たれた(表3)。この結果は、SDI-1が老化細胞特異的DNA合成阻害因子であり、それに対し、SDI-2とSDI-3は、細胞サイクル調節に関連するより一般的な阻害因子であることがはたは間違いないと思われる。

実施例7

細胞老化中のポリA RNA含量の変化

ポリA+RNAノーザン分析と総RNAノーザン分析の結果が定量的に異なるという観察は、総RNA製剤中のポリA+RNA含量が、細胞老化中に低下したのかも知れないことを示した。この仮説を試験するために、細胞を連続的に培養し、総RNAを異なる段階で抽出し、ポリA+RNAは、各試料から分離された。

結果は明らかにポリA+RNA含量が細胞老化中に次第に減少したことを示していた(図4)。図4では、細胞を連続的に培養し、総RNAを採取した。ポリA+RNA:総RNA%を培養日(イン・ビトロでの寿命終了%)に対してプロットした。老化細胞は、非常に若い細胞と比較した場合、3-4倍少ないポリA+RNAを有していた。しかしながら、細胞当たりの総RNA量を計算した場合、

表2: ノーザン分析の定量的値						
区画	SDI-1		SDI-2		SDI-3	
	Y	S	Y	S	Y	S
SDIの相対量	1.0	3.3	1.0	0.31	1.0	0.31
GAPDHの相対量	1.0	0.37	1.0	0.36	1.0	0.38
SDI/GAPDHの相対量	1.0	9.3	1.0	0.86	1.0	0.82

細胞老化中、SDI-1情報は約3倍増加したが、一方SDI-2およびSDI-3情報は3倍減少した。同じフィルターをβ-アクトリンと再ハイブリダイズさせ、次に内部対照としてGAPDHプローブと再ハイブリダイズさせた。その結果は、いずれの対照遺伝子の発現も細胞老化中に、約3倍減少したことを示していた。以前の研究では、細胞老化中β-アクトリン発現が2-3倍は減少することが観察されている(クマザキ、T.等、イクスペリメンタル・セル・リサーチ、1952、13-19頁(1991年); センナドリ、T.およびキャンビシ、J.、サイエンス、247巻、205-209頁(1990年); フェース、J. J.、ジャーナル・オブ・ゲノミクス、46巻、1122-124頁(1991年))。老化細胞においてβ-アクトリンおよびGAPDH遺伝子の発現がいずれも減少したことから、ノーザン分析用にポリA+RNAを使用することになった。ポリA+RNAを、表2で用いられた総RNAと同様物から分離し、SDI cDNAとハイブリダイズさせ、続いてβ-アクトリンおよびGAPDHそれぞれとプローブした(表3)。表3は、若い細胞(Y)と老化細胞(S)におけるSDI遺伝子発現のポリA+RNAノーザン分析の結果を示すものである。若い細胞と老化細胞由来のポリA+RNAの各1μgを分析に用いた。各試料におけるSDI mRNAの相対量は表2のように計算した。

老化細胞は、若い細胞より1.3-1.5倍多く有していた(クリストファー、V. J.およびクリューフスカー、D.、メディカル・イクスペリメンツ、19巻、913-920頁(1969年)参照)。

SDI-1情報が老化細胞中、次第に増加するかどうか、また、迅速な増加が、イン・ビトロでの寿命の終了に起こるかどうかを判定するために、異なる段階での培養物由来のポリA+RNAを32P-標識SDI-1プローブとハイブリダイズさせた。この分析から、SDI-1発現は、培養物が老化するにつれて増加し、最終の段階で最大に増加することが明らかになった(表4)。表4は、細胞老化過程でのSDI-1 mRNAの量を表している。異なる段階での細胞由来のポリA+RNAの各1μgをSDI-1プローブとハイブリダイズさせた。各試料中のSDI-1 mRNA相対量は、表2と同様に計算した。

表4: 寿命終了%の定量的値							
区画	24%	37%	46%	66%	78%	88%	100%
GAPDHの相対量	1.0	1.5	1.5	1.3	1.4	1.3	0.0
SDI/GAPDHの相対量	1.0	2.2	2.1	4.0	3.5	6.2	20.5

静止中のSDI-1発現における変化もまた調べた。若い静止細胞を0.5%胎児ウシ血清(FBS)含有培地中に、3週間まで保持した。総RNAを各週採取し、SDI-1プローブとハイブリダイズするRNAを分析した。SDI-1情報は、細胞静止中に増加した(表5)。表6は、細胞静止中のSDI-1 mRNAの量を表している。0.5%FBS含有培地で、2、3週間培養した若い細胞から得られた総RNAの各4μgを、SDI-1プローブとハイブリダイズさせた。SDI-1 mRNAの相対量は、表2と同様に計算した(C: 10%FBS培地での対照培養)。その結果をGAPDH発現に対して標準化すると、SDI-1発現は、2週間後、10%FBS培地における対照細胞培養の値と比較して低血清培地で18倍増加したことが見出された。

表5: 細胞静止中のSDI-1 mRNAの蓄積				
属性	C	1週	2週	3週
GAPDHの相対量	1.0	0.72	0.88	0.37
SDI-1/GAPDHの相対量	1.0	12.2	18.4	14.9

mRNA対総RNAの細胞表現 (cellular representation) が、細胞老化中に変化することが見いだされた事実は、重要である。イン・ビトロでの加齢の過程に、細胞当たりの総RNAが僅かに増加するにも関わらず、mRNA含量は、次第に減少することが分かった (図4)。この現象は、細胞加齢の過程で、全遺伝子発現が次第に低下することを示しており、また、ノーザンブロット分析を総RNAで行った場合に、老化細胞においてβ-アクトリンとGAPDH遺伝子の発現が低下したことを説明するものである (表2)。しかしながら、若い細胞と老化細胞の間のこれらのハウスキーピング遺伝子 (housekeeping genes) の発現レベルは、ノーザンブロット分析をポリA+RNAで行った場合では、ほとんど一定であった (表3)。この分析により、SDI-1情報は、老化細胞において効力に発現し、SDI-1-2およびSDI-1-3遺伝子はイン・ビトロでの寿命を通して変化し、発現することが明らかになった。

実施例8

SDI-1遺伝子

SDI-1遺伝子は、老化細胞特異的DNA合成阻害因子をコードする。この遺伝子の発現増加は、細胞がそれらの最終の分裂期に入った時に起こる (表4)。発現調節は、老化細胞の複製型とよく相関している。SDI-1遺伝子発現もまた、若い細胞を血清欠乏により静止させ、分裂しないようにした後に、増加することが見いだされた。この結果は、老化と同じく細胞静止のDNA合成阻害においてもこの遺伝子が関与することを示している。血清成長因子の欠乏により静止状態にされた細胞が、老化細胞由来の阻害因子と同様の特性を持つDNA合成阻害因子を生産することが示されている (ベレイラスミス, O.M.等, イクスベリメンタル・セル・リサーチ, 160巻, 297-306頁 (1985年))

の僅かに異常な電荷またはコンホメーションが原因であり得る。細胞的に発現したタンパク質の部分的なアミノ酸配列は、転写断片を立証するものであった (配列番号2)。

細胞的に発現したタンパク質は、個々の天然タンパク質に対するポリクローナル抗血清およびモノクローナル抗体を発生させるために用いられた。このような抗体は、SDI-1タンパク質およびSDI-1タンパク質複合体 (complex) の免疫沈降において、合成ペプチドから生成された抗血清よりも効果的であり得る。予備的な免疫細胞化学研究は、1:20,000希釈でのウェスタン・トランスファ (a western transfer) で融合タンパク質と強力に反応する最も高親和性の抗血清 (抗血清ナンバ55) を用いて、SDI-1タンパク質が、分裂中の若い細胞と比較して老化細胞において相対的に豊富であることを示唆した。老化細胞において、その位置は、核周囲であるように見えるのに対し、若い細胞では、核内に位置した少量のSDI-1タンパク質であるように見える。特異的に染色させるには、検出可能なレベルのSDI-1 mRNAを発現しない細胞 (TE85) の固定化細胞膜層に対する抗血清を膜に吸収する必要がある。当該細胞は、4%パラホルムアルデヒド、次にメタノールで固定した。

通常、低レベルで遺伝子を発現する細胞において引き起こされたSDI-1 mRNAの発現から生じる細胞表現型を研究し、アンチセンスSDI-1情報物の効果を調べるためには、SDI-1遺伝子が誘導プロモーターの制御下、安定的に発現される細胞ラインを得ることが望ましい。この目標のために、メタロチオニンプロモーターの制御下、SDI-1を含む有能なベクターを構築した。この構築物を若い増殖コンピテント細胞にトランスフェクションした後、100μM塩化銅と2μM増化カドミウムの存在下でインキュベーションして、DNA合成の開始を約50%まで阻害した。金属の不在下では、DNA合成の阻害はなかった。対照ベクター (pCDSRα) と共にトランスフェクションし、金属の存在下で成長させた細胞は、金属の不在下で成長させた同じプラスミドと共にトランスフェクションした細胞の約90%のDNA合成能力を有することが見いだされていることから、観察された阻害活性は、金属毒性が原因ではない。

ステイン, G.H. およびアトキンス, L., プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・USA, 83巻, 9030-9034頁 (1986年)。

SDI-1発現が老化中および静止中のいずれでも増加するという事実は、それがDNA合成阻害因子であることを示している (スミス, J.R., ジャーナル・オブ・ゲノミクス, 45巻, 832-835頁 (1990年): 本明細書に参照して組み込んである)。あるいは、SDI-1配列は、最近マウス細胞からクローン化された成長停止に特異的な遺伝子群と関係があるかも知れない (シュナイダー, C.等, セル, 54巻, 787-793頁 (1988年): マンフィオレッチ, G.等, モレキュラー・セル・バイオロジー, 10巻, 2924-2930頁 (1990年))。

実施例9

SDI-1遺伝子発現物の発現

2種の異なる細胞性発現系において発現されたSDI-1 cDNAを、イン・ビトロで転写させ、2種の異なるイン・ビトロ系で翻訳させた。2種の細胞性発現系は、十分なSDI-1タンパク質を得る容量を最大限にするために用いた。第一の発現系では、SDI-1タンパク質は、グルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質として、細胞培養物のリットル当たり5-10μgの収率で発現した。融合タンパク質をトロンビンで切断し、簡便して、個々の成分のアミノ酸を持つSDI-1タンパク質を得ることが出来た。第二の発現系では、翻訳を助けるために6ヒスチジンアミノ末端タグ (terminal tag) を利用した。この融合タンパク質は、更に手を加えることなく、使用できる。いずれの系でも、純粋なタンパク質調製物を分離可能であった。

この実験の過程では、イン・ビトロでの転写および翻訳系を用いて、SDI-1 cDNAの核内配列から誘導される転写断片 (open reading frame) を改変した。SDI-1タンパク質の計算による分子量は、約16,000ダルトンである。イン・ビトロで合成されたタンパク質は、SDS PAGEにより、約21,000ダルトンの相対移動度で移動する。この小さな違いは、SDI-1

SDI-1で観察された阻害効果が発現を誘導するために用いられた特定のプロモーターの性質に関連していないことを示すために、他のプロモーターから発現された、SDI-1のDNA合成阻害能力を調査した。それ故に、若い増殖性ヒト胎児腎細胞をCMV-β-galおよびCMV-SDI-1と共に同時トランスフェクションした。CMV-β-galと細胞のトランスフェクションは、DNA合成にほとんど影響しなかったが、一方、CMV-SDI-1は、これらの特定の実験におけるpCDSRαベクターでのSDI-1よりも効果的でさえあった。

SV40ラージT抗原は、老化細胞を誘導してDNAを合成させる能力がある。それ故に、SDI-1の阻害作用が、T抗原の発現により克服されるかどうかを決定することは、興味深いものであった。更に、SDI-1の作用が細胞における一般的な代謝不均衡の誘導のせいではないことを決定することが望まれていた。もし、そうであれば、誰もラージT抗原がその効果と相対するとは予想しないであろう。これらの理由により、細胞を、SDI-1 cDNA、およびT抗原がその中でCMVプロモーターにより駆動されるベクターと共に同時トランスフェクションした。このような同時トランスフェクション実験により、SDI-1の阻害活性は、SV40ラージT抗原の同時発現により大幅に軽減されることが明らかになった。

一時的トランスフェクションアッセイ (Transient transfection assays) は、増加したヒト正常胎児腎細胞細胞ライン (原発性包膜細胞ライン (CSC303)) およびWI38イモータル細胞ライン (immortal cell line) を用いて実施し、SDI-1の大部分の阻害効果の可逆性を判定した。いずれの場合でも、かなりの阻害 (40-50%) が観察された。更に、SDI-1は、SV40形質転換細胞ラインGM639またはヘラ細胞 (<20%) だけでなくSUSM1 (40%) を阻害することが分かった。ここまでの結果は、ヘラ細胞およびSV40ウイルスで形質転換された細胞が老化細胞と融合することによって阻害されないという、ヘテロカリオン実験から得られた以前の結果と一致している。このことは、SDI-1が、老化細胞において以前に検出された阻害因子と同様の挙動をする

ことの更なる証拠を与えるものである。

実施例 10

SDI-1 遺伝子のサザン分析

SDI-1 の不妊または不活性が不妊症に対する 4 種の相補グループのいずれかにおける細胞不活性の原因なのかどうかを判定するために、染色体 DNA と mRNA を 4 種のグループを代表する細胞ラインから調べた。サザン分析により、Eco RI での消化後、予想された 5 および 10 kb バンドが明らかになった。それ故に、これらの細胞ラインの SDI-1 遺伝子中では大きな欠失または転位は全く起っていない。ノーザン分析により、SDI-1 mRNA は、相補グループ B および C に割り当てられている細胞ラインにおいては、少くまたは存在しないことが判定された。SDI-1 は、相補グループ A および D を代表する細胞ラインにおいては、より高いレベルで存在した。この結果は、細胞ラインが細胞を化をのがれ得るような細胞の一部が、活性 SDI-1 遺伝子の十分なレベルを発現する能力の欠損によることを示唆している。

当該発明は、それらの特定の遺伝子型に開示して記載されているが、それは更に修飾出来、またこの出願は、一般に、当該発明の原理に従い、また当該発明が属する技術分野の公知または慣用の範囲に属するような、および以上に述べた本質的な特徴に適用され得るような、更に添付の請求範囲に従うような、本開示からの発展を含む、当該発明のどのような変形、使用または適用にも及ぶことを意図していると理解されるであろう。

(1) 一般的情報:

- (i) 特許出願人: ベイラー・カレッジ・オブ・メディシン
- (ii) 発明の名称: 老化細胞由来 DNA 合成阻害因子
- (iii) 配列の数: 2
- (iv) 連絡先:
 - (A) 名称: ヴァイル・ゴッタル・アンド・メンジェス
 - (B) 通り: エヌ・ダブリュー・エル・ストリート、1615 番地
 - (C) 市: フシントン
 - (D) 州: ディー・シー
 - (E) 国: アメリカ合衆国
 - (F) ZIP: 20036
- (v) コンピューター接続形式:
 - (A) 媒体型: フロッピー・ディスク
 - (B) コンピューター: IBM PC 互換型
 - (C) オペレーティング・システム: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) ソフトウェア: Patent In Release 81.0, Version #1.2.5
- (vi) 本出願のデータ:
 - (A) 出願番号:
 - (B) 出願日:
 - (C) 分類:

(vi) 優先権出願データ

- (A) 出願番号: US 07/808,523
- (B) 出願日: 1991 年 12 月 16 日

(vi) 弁理士/代理人情報:

- (A) 氏名: オイエルバハ、ジェフリー・アイ
- (B) 登録番号: 32,680
- (C) 参照/登録番号: 225-102-CIP

(ix) 電話連絡先情報:

- (A) 電話番号: (202) 682-7033
- (B) ファックス番号: (202) 857-0939

(2) 配列番号 1 の情報:

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 2106 塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 組の数: 一本組
- (D) トポロジー: 直線状

(ii) 配列の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル: No

(iv) アンチセンス: No

(v) 起源:

- (A) 生物名: ホモ・サピエンス
- (B) 細胞の種類: 老化ヒト細胞

(vi) 直線の起源:

- (A) ライブラリー名: 老化細胞由来 cDNA ライブラリー
- (B) クローン名: SDI-1

(ii) 配列: 配列番号 1:

```

CCTGCGGAG TGAATGCTT GTGAGCGG AGCTGGGGG GGAATGGCG AGGACCGAG 60
GCATCCAGC GAGCGCCAT GTGAGAGCG GCTGGGATC TCGTCAGAA CCAATGGGG 120
AGCAGGCGT CCGCGCGCT CTGAGGCGA GTGAGAGCG AGGACCGAG CCGGAGCTT 180
GATCGCTAA TCGCGGCTG CATCGAGAG GCGGCTGAG CAGCAACTT CCACTTTTC 240
ACCGAGACG CACTGAGGG TCACTTGGC TGGAGGCTG TCGCGGCTT TCGCTGGCC 300
AGCTTACG TCGGAGCG GCGCGCGGA GCGCGGATG AGTTGGGAG AGGAGGCGG 360
CCTGGGACT CACTGCTCT GCTGAGGCG AGGAGGAGG AGGAGGATG GAGGCTGTC 420
CTCTGTGTA GCTTTGCGC TCGCTGAGC GAGGCGGCT AGGCTGCGC AGGCTGAGCT 480
GGAGACTTC AGGCTGAAA AGGCGCGAG AGGAGGATG CAGATTCTA CCACTCGAA 540

```

```

CGCGCGTGA TCTTCTGGA GAGGAGCGG TATCGCGG AGGAGGCGG TCGAGTCTG 600
GAGGCGGAG GCGCTCAAG GCGCGCTGA CATCTCTGC CTACTCTCA CTCTGTCTT 660
CTTAATATT ATTGCTGTT TAAATTAAC AGCTGCTCAT GTACATAGC TCGCGCGCG 720
CTCGCGCGA GCGCTGCGA TTGAATATT TAAACAAA AGTGGCGCT TGAATGAGG 780
CTCTGAGA CTCTGCGA TTTTATTT ATGAATACT ATTAAAGC TCGCATGCG 840
GTGCTCTCT TTTGCTCTT CCGGAGCTT GCGTGGCGG GCTTCACTG AGCTACTTC 900
TCTCGCGAC TTTGCGGCT GCTGCTACG TCTGAGGAG TCTGCTCTT TCGCATGCT 960
TCTGAGCGG CTATGAAAT TCGCGGCTT TCGTGGAGC TCGAGCGGA ATTCTTTTC 1020
ATTGAGAGG TAAAGAGAT GCATTTGAA GCGCGCTAC GAGTGGCGG CATCATCAA 1080
AGCTTGAAG TCGGCTGAG TCGCTGAGG TCGGCGAGC TCGAGCGGA GTGAGCACG 1140
CGTGGCGCT AGCTGGGAG CTGCTGAGC CTGCTGCTT GATAGCGCG TCTGTCTCT 1200
GAGGCGGCG GGAAGTGGG GTCTGAGC AGAGCGCGG GCTGCGCTC ATGCGCGCTC 1260
TGAGTGGAG TCGGAGGCG GTCTGAGT TGAAGCTTT CTCTGTTGG GTGCGCTGA 1320
CGTTTGAGG AGCGCGAGT AGCTTCTTC TCGAGCTGG CTCTGAGTT CCGCTCTCT 1380
GCTGCTCTC CCGCTGCTC TTTGCTTCA GTAGCTCTC AGCTGAGCT GCGCTGAGG 1440
TGGCTGCTC AGCGCGCGG CCGCTCAAT GCACTGGAG GCGAGGCGG AGGAGGAGG 1500
AGGCGCGCG TAGTCTTAC TCGGCGAGT CAGGCGGGA CCGCGCGCT CTCTAGCTT 1560
GCGGCTGAG GTGCGATGT GTGCGAGCG CCGCTTGAAG TGGGTTATC TCTGTGTTG 1620
GCGTATGCA TCGGCGACT CATCTTTCT GAGGAGGAG AGTGGCGCTT CAAATGTTT 1680
AGGAGCTTC CTGATGCGC CCACTGCTC CCACTTCAIT GCACTTTGAT TAGGAGCGA 1740
AGGAGGACT AGCATTTTA AGATGCTGC AGTAGAGCT ATGAGAGCG CATGCGAGT 1800
GCGCTCATAT GCGGCTGGA GTAGTTGCT TCGTGGAGC TAACTTGAAG CCGCTGAGG 1860
CACTGAGCT CTAGTGTAG TCGAGTATG GCGGCTGAG CCGAGGAGC TCGAGCTTC 1920
TGAAGATAG TCGGCGGAG TTTTCTCTT GCGGCGGGA TCTGCTCTG TCGGCTTTC 1980
TCAAGTAGA CTGTAAGCT CTGAGGCGA GCGAGGAGC CCGTACTCT TCTGTGCTT 2040
TCAAGCTTC TCGGAGATG CTGATAGA GCGGCTGCT AATAAGAT TCTTAGTGA 2100
AAAAAA 2106

```

(2) 配列番号2の情報:

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 164アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(5) 配列の種類: タンパク質

(E) ハイポセティカル: No

(H) アンチセンス: No

(N) 起源:

(A) 生物名: ホモ・サピエンス

(B) ストレイン: SD1-1

(d) 直接の起源:

(A) ライブラリー名: 老化細胞由来cDNAライブラリー

(x) 配列: 配列番号2:

Met Ser Gln Pro Ala Gly Asp Val Arg Gln Asn Pro Cys Gly Ser Lys
1 5 10 15
Ala Cys Arg Arg Leu Phe Gly Pro Val Asp Ser Gln Gln Ser Arg
20 25 30
Asp Cys Asp Ala Leu Met Ala Gly Cys Ile Gln Gln Ala Arg Gln Arg
35 40 45
Trp Asn Phe Asp Phe Val Thr Gln Thr Pro Leu Gln Gly Asp Phe Ala
50 55 60
Trp Gln Arg Val Arg Gly Leu Gly Leu Pro Lys Leu Tyr Leu Pro Thr
65 70 75 80
Gly Pro Arg Arg Gly Arg Asp Gln Leu Gly Gly Arg Arg Pro Gly
85 90 95
Thr Ser Pro Ala Leu Leu Gln Gly Thr Ala Gln Gln Asp His Val Asp
100 105 110
Leu Ser Leu Ser Cys Thr Leu Val Pro Arg Ser Gly Gln Gln Ala Gln
115 120 125
Gly Ser Pro Gly Gly Pro Gly Asp Ser Gln Gly Arg Lys Arg Arg Gln
130 135 140
Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg Leu Ile Phe Ser
145 150 155 160
Lys Arg Lys Pro

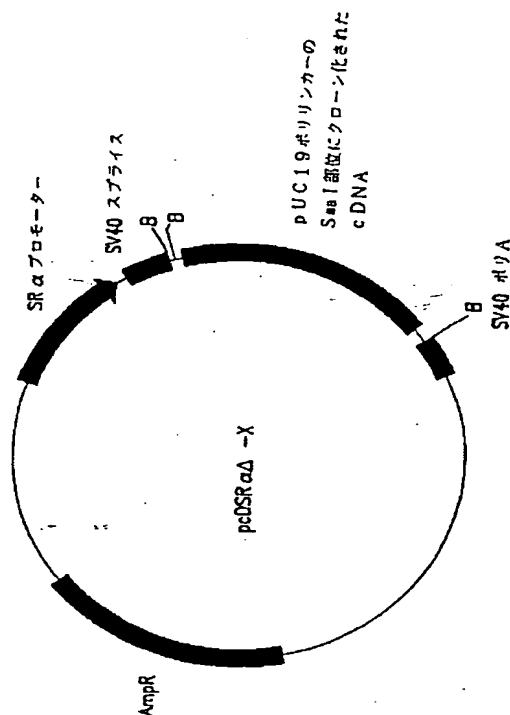


図 1

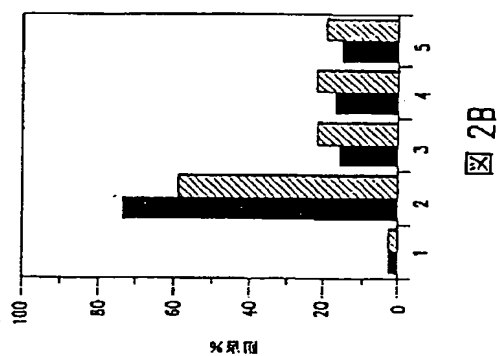


図 2B

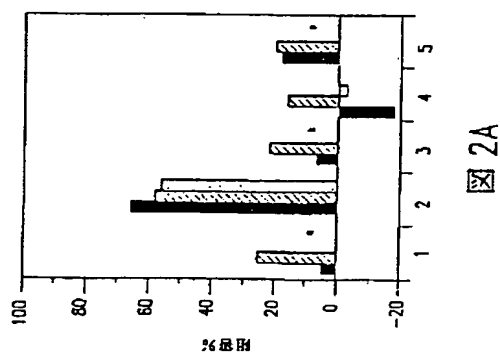


図 2A

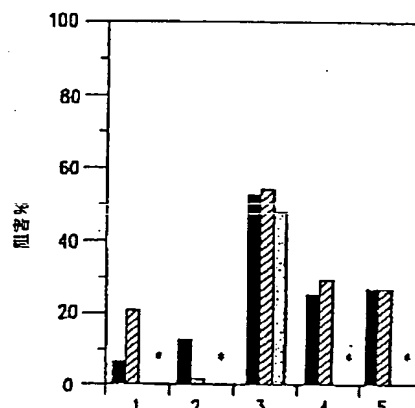


図 2C

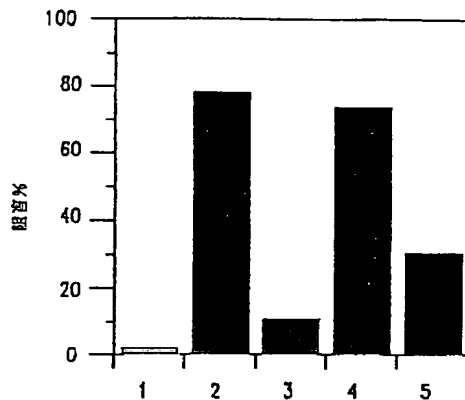
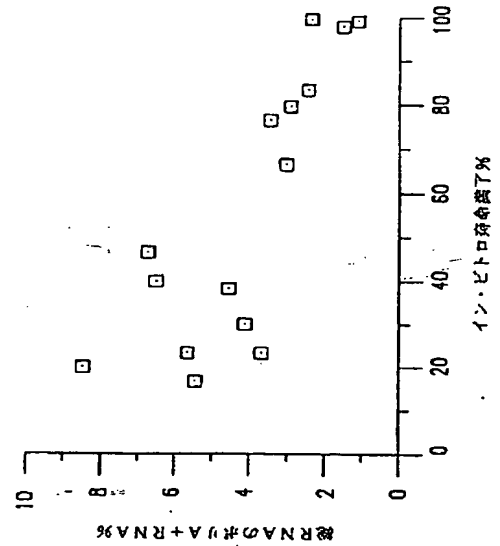


図 3



4

1: cct gcc gaa gtc agt tcc ttg tgg agc cgg agc tgg gcg cgg att
 46: cgc cga ggc acc gag gca ctc aga gga ggc gcc atg tca gaa cgg
 91: gct ggg gat gtc cgt cag aac cca tgc ggc agc aag gcc tgc cgc
 136: cgc ctc ttc ggc cca gtg gac agc gag cag ctg agc cgc gac tgt
 181: gat gcg cta atg ggc ggc tgc atc cag gag gcc cgt gag cga tgg
 226: aac ttc gac ttt gtc acc gag aca cca ctg gag ggt gac ttc gcc
 271: tgg gag cgt gtc cgg ggc ctt ggc ctg ccc aag ctc tac ctt ccc
 316: acg ggg ccc cgg cga ggc cgg gat gag ttg gga gga ggc agg cgg
 361: cct ggc acc tca cct gct ctg ctg cag ggg aca gca gag gaa gac
 406: cat gtg gac ctg tca ctg tct tgt acc ctt gtg cct cgc tca ggg

451: gag cag gct gaa ggg tcc cca ggt gga cct gga gac tct cag ggt
 496: cga aac cgg cgg cag acc agc atg aca gat ttc tac cac tcc aac
 541: cgc cgg ctg atc ttc tcc aag agg aag ccc taa tcc gcc cac agg
 586: aag cct gca gtc ctg gaa gcg cga ggg cct caa agg ccc gct cta
 631: cat ctt ctg cct tag tct cag ttt gtg tgt ctt aat tat tat ttg
 676: tgt ttt aat tta aac acc tcc tca tgt aca tac cct ggc cgc ccc
 721: ctg ccc ccc agc ctc tgg cat tag aat tat tta aac aac aac tag
 766: gcg gti gaa tga gag gtt cct aag agt gct ggg cat ttt tat ttt
 811: atg aac tac tat tta aag cct cct cat ccc gtg ttc tcc ttt tcc
 856: tct ctc ccg gag gtt ggg tgg gcc ggc ttc atg cca gct act tcc
 901: tcc tcc cca ctt gtc cgc tgg gtg gta ccc tct gga ggg gtg tgg
 946: ctc ctt ccc atc gct gtc aca ggc ggt tat gaa att cac ccc ctt
 991: tcc tgg aca ctc aga cct gaa ttc ttt ttc att tga gaa gta aac

FIG.5A

FIG.5B

特表平7-502651 (15)

1711: cca gtt cat tgc act ttg att agc agc gga aca agg agt cag aca
1756: ttt taa gat ggt ggc agt aga ggc tat gga cag ggc atg cca cgt
1801: ggg ctc ata tgg ggc tgg gag tag ttg tct ttc ctg gca cta acg
1846: ttg agc ccc tgg agg cac tga agt gct tag tgt act tgg agt att
1891: ggg gtc tga ccc caa aca cct tcc agc tcc tgt aac ata ctg gcc
1936: tgg act gtt ttc tct cgg ctc ccc atg tgt cct ggt tcc cgt ttc
1981: tcc acc tag act gta aac ctg tgg agg gca ggg acc aca ccc tgt
2026: act gtt ctg tgt ctt tca cag ctg ctg cca caa tgc tga tat aca
2071: gca ggt gct caa taa acg att ctt agt gaa aaa aaa

FIG.5D

FIG.5C

國際互傳

International application No.
PCT/US92/02908

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC class.

C 12 C 1/00, 1/02, 1/04, C 12 P 2106, 4903; C 12 H 3/00, 2500; C 97 B 39/05, 53/11, 57/00.

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), AU, CA, JP

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成12年4月18日(2000.4.18)

【公表番号】特表平7-502651
 【公表日】平成7年3月23日(1995.3.23)
 【年通号数】
 【出願番号】特願平5-511170
 【国際特許分類第7版】

C12N 15/09
 A61K 31/70 AED
 48/00

【FI】

C12N 15/00 A
 A61K 31/70 AED
 48/00

手続補正書

平成11年11月12日

特許庁長官様

1. 事件の名称

平成05年特許第511170号

2. 補正をする者

名称 ベイラー・カレッジ・オブ・メディシン

名称 明治製菓株式会社

3. 代理人

住所 〒540-0001
 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 Iビル
 電話(06)6949-1261
 FAX (06)6949-0362

署名 青木士 (5214) 青木 誠



4. 補正対象書類名

要約書

5. 補正対象項目名

名称

6. 補正の内容

- (1) 明細書16頁下から2行の「配列」を「配列に相補的な」に訂正する。
 - (2) 同16頁末行から17頁1行にかけての「配列に相補的な」を削除する。
 - (3) 同17頁9行の「SD(コード化)」を「SD(コードする)」に訂正する。
 - (4) 同18頁17ないし18行の「ホスホアミナイト」を「ホスホルアミナイト」に訂正する。
 - (5) 同28頁5ないし6行、および、35頁下から9行の「脂肪ウシ」を「ウシ脂肪」に訂正する。
 - (6) 同37頁13行の「生成物」を「原料」に訂正する。
 - (7) 同43頁を初版のとおり訂正する。
- (注：差違頁中の訂正部分は、記載位置配列のうち22行の配列番号1844ないし1845において「GC」とあるを、FIG. 6Dに記載のとおり「CG」に変更した箇所であり、それ以外の変更はない。)

以上

—補 2—



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

<p>(51) International Patent Classification 5 : C12Q 1/00, 1/02, 1/68 C12P 21/06, 19/34, C12N 5/00 C12N 15/00, C07H 19/06, 15/12 C07H 17/00</p>	A1	<p>(11) International Publication Number: WO 93/12251</p> <p>(43) International Publication Date: 24 June 1993 (24.06.93)</p>
<p>(21) International Application Number: PCT/US92/10904</p> <p>(22) International Filing Date: 15 December 1992 (15.12.92)</p> <p>(30) Priority data: 808,523 16 December 1991 (16.12.91) US 970,462 2 November 1992 (02.11.92) US</p> <p>(71) Applicant: BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE [US/ US]; One Baylor Plaza, Houston, TX 77030 (US).</p> <p>(72) Inventor: SMITH, James, R. ; 10311 Cliffwood, Houston, TX 77030 (US).</p> <p>(74) Agents: AUERBACH, Jeffrey, I. et al.; Weil, Gotshal & Manges, 1615 L Street, NW, Washington, DC 20036 (US).</p>		<p>(81) Designated States: AU, CA, JP, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Published With international search report.</p>
<p>(54) Title: SENESCENT CELL DERIVED INHIBITORS OF DNA SYNTHESIS</p> <div data-bbox="464 1199 1266 1755" style="text-align: center;"> </div> <p>(57) Abstract</p> <p>An expression vector cDNA library derived from senescent cells has been used to isolate cDNA clones that encode inhibitors of DNA synthesis. Such inhibitors play a role in cellular senescence and aging. Antisense nucleic acids reduce the inhibition of DNA synthesis.</p>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	FR	France	MR	Mauritania
AU	Australia	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	United Kingdom	NL	Netherlands
BE	Belgium	GN	Guinea	NO	Norway
BF	Burkina Faso	GR	Greece	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	HU	Hungary	PL	Poland
BJ	Benin	IE	Ireland	PT	Portugal
BR	Brazil	IT	Italy	RO	Romania
CA	Canada	JP	Japan	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KZ	Kazakhstan	SK	Slovak Republic
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Germany	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Denmark	ML	Mali	US	United States of America
ES	Spain	MN	Mongolia	VN	Viet Nam
FI	Finland				

- 1 -

SENESCENT CELL DERIVED INHIBITORS OF DNA SYNTHESISFIELD OF THE INVENTION

The present invention is in the field of recombinant DNA technology. This invention is directed to a gene sequence and
5 a protein that effects the ability of cells to become senescent. This invention was supported with Government funds. The Government has certain rights in this invention.

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application is a continuation-in-part of U.S. patent
10 application serial no. 07/808,523 (filed December 16, 1991), herein incorporated by reference.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Normal human diploid cells have a finite potential for
proliferative growth (Hayflick, L. et al., Exp. Cell Res.
15 25:585 (1961); Hayflick, L., Exp. Cell Res. 37:614 (1965)).
Indeed, under controlled conditions in vitro cultured human
cells can maximally proliferate only to about 80 cumulative
population doublings. The proliferative potential of such
cells has been found to be a function of the number of
20 cumulative population doublings which the cell has undergone
(Hayflick, L. et al., Exp. Cell Res. 25: 585 (1961); Hayflick,
L. et al., Exp. Cell Res. 37: 614 (1985)). This potential is
also inversely proportional to the in vivo age of the cell
donor (Martin, G.M. et al., Lab. Invest. 23:86 (1979);

- 2 -

Goldstein, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 64:155 (1969); Schneider, E.L., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 73:3584 (1976); LeGuilty, Y. et al., Gereontologia 19:303 (1973)).

5 Cells that have exhausted their potential for proliferative growth are said to have undergone "senescence." Cellular senescence in vitro is exhibited by morphological changes and is accompanied by the failure of a cell to respond to exogenous growth factors. Cellular senescence, thus, represents a loss of the proliferative potential of the cell. Although a variety of theories have been proposed to explain the phenomenon of cellular senescence in vitro, experimental evidence suggests that the age-dependent loss of proliferative potential may be the function of a genetic program (Orgel, 10 L.E., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 49:517 (1963); De Mars, R. et al., Human Genet. 16:87 (1972); M. Buchwald, Mutat. Res. 44:401 (1977); Martin, G.M. et al., Amer. J. Pathol. 74:137 (1974); Smith, J.R. et al., Mech. Age. Dev. 13:387 (1980); Kirkwood, T.B.L. et al., Theor. Biol. 53:481 (1975).

20 Cell fusion studies with human fibroblasts in vitro have demonstrated that the quiescent phenotype of cellular senescence is dominant over the proliferative phenotype (Pereira-Smith, O.M. et al., Somat. Cell Genet. 8:731 (1982); Norwood, T.H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 71:223 25 (1974); Stein, G.H. et al., Exp. Cell Res. 130:155 (1979)).

Insight into the phenomenon of senescence has been gained from studies in which senescent and young (i.e. non-senescent) cells have been fused to form heterodikaryons. In order to induce senescence in the "young" nucleus of the heterodikaryon (as determined by an inhibition in the synthesis of DNA), 30 protein synthesis must occur in the senescent cell prior to fusion (Burmer, G.C. et al., J. Cell. Biol. 94:187 (1982); Drescher-Lincoln, C.K. et al., Exp. Cell Res. 144:455 (1983); Burner, G.C. et al., Exp. Cell Res. 145:708 (1983); Drescher- 35 Lincoln, C.K. et al., Exp. Cell Res. 153:208 (1984).

Likewise, microinjection of senescent fibroblast mRNA into young fibroblasts has been found to inhibit both the

- 3 -

ability of the young cells to synthesize DNA (Lumpkin, C.K. et al., Science 232:393 (1986)) and the ability of the cells to enter into the S (stationary) phase of the cell cycle (Lumpkin, C.K. et al., Exp. Cell Res. 160:544 (1985)).

5 Researchers have identified unique mRNAs that are amplified in senescent cells in viro (West, M.D. et al., Exp. Cell Res. 184:138 (1989); Giordano, T. et al., Exp. Cell Res. 185:399 (1989)).

The human diploid endothelial cell presents an

10 alternative cell type for the study of cellular senescence because such cells mimic cellular senescence in vitro (Maciag, T. et al., J. Cell. Biol. 91:420 (1981); Gordon, P.B. et al., In Vitro 19:661 (1983); Johnson, A. et al., Mech Age. Dev. 18:1 (1982); Thornton, S.C. et al., Science 222:623 (1983);

15 Van Hinsbergh, V.W.M. et al., Eur. J. Cell Biol. 42:101 (1986); Nichols, W.W. et al., J. Cell. Physiol. 132:453 (1987)).

In addition, the human endothelial cell is capable of expressing a variety of functional and reversible phenotypes.

20 The endothelial cell exhibits several quiescent and non-terminal differentiation phenotypes (Folkman, J. et al., Nature 288:551 (1980); Maciag, T. et al., J. Cell Biol. 94:511 (1982); Madri, J.A. et al., J. Cell Biol. 97:153 (1983); Montesano, R., J. Cell Biol. 99:1706 (1984); Montesano, R. et

25 al., J. Cell Physiol. 34:460 (1988)).

It has been suggested that the pathway of human cell differentiation in vitro involves the induction of cellular quiescence mediated by cytokines that inhibit growth factor-induced endothelial cell proliferation in vitro (Jay, M. et

30 al., Science 228:882 (1985); Madri, J.A. et al., In Vitro 23:387 (1987); Kubota, Y. et al., J. Cell Biol. 107:1589 (1988); Ingber, D.E. et al., J. Cell Biol. 107:317 (1989)).

Inhibitors of endothelial cell proliferation also function as regulators of immediate-early transcriptional

35 vents induced during the endothelial cell differentiation in vitro, which involves formation of the capillary-like, tubular endothelial cell phenotype (Maciag, T., In: Imp. Adv. Oncol.

- 4 -

(De Vita, V.T. et al., eds., J.B. Lippincott. Philadelphia, 42 (1990); Goldgaber, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:7606 (1990); Hla, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 167:637 (1990)). The inhibitors of cell proliferation that include:

1. Interleukin-1a (IL-1a) (Montesano, R. et al., J. Cell Biol. 99:1706 (1984); Montesano, R. et al., J. Cell Physiol. 122:424 (1985); Maciag, T. et al. (Science 249:1570-1574 (1990));
2. Tumor necrosis factor (Frater-Schroder, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:5277 (1987); Sato, N. et al., J. Natl. Cancer Inst. 76:1113 (1986); Pber, J.P., Amer. J. Pathol. 133:426 (1988); Shimada, Y. et al., J. Cell Physiol. 142:31 (1990));
3. Transforming growth factor- β (Baird, A. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 138:476 (1986); Mullet, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:5600 (1987); Mairi, J.A. et al., J. Cell Biol. 106:1375 (1988));
4. Gamma-interferon (Friesel, R. et al., J. Cell Biol. 104:689 (1987); Tsuruoka, N. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 155:429 (1988)) and
5. The tumor promoter, phorbol myristic acid (PMA) (Montesano, R. et al., Cell 42:469 (1985); Doctrow, S.R. et al., J. Cell Biol. 104:679 (1987); Montesano, R. et al., J. Cell. Physiol. 130:284 (1987); Hoshi, H. et al., FASAB J. 2:2797 (1988)).

The prospect of reversing senescence and restoring the proliferative potential of cells has implications in many fields of endeavor. Many of the diseases of old age are associated with the loss of this potential. Also the tragic disease, progeria, which is characterized by accelerated aging is associated with the loss of proliferative potential of cells. Restoration of this ability would have far-reaching implications for the treatment of this disease, of other age-related disorders, and, of aging per se.

- 5 -

In addition, the restoration of proliferativ potential of cultured cells has uses in medicine and in the pharmaceutical industry. The ability to immortalize nontransformed cells can be used to generate an endless supply of certain tissues and also of cellular products.

The significance of cellular senescence has accordingly been appreciated for several years (Smith, J.R., Cellular Ageing, In: Monographs in Developmental Biology; Sauer, H. W. (Ed.), S. Karger, New York, N.Y. 17:193-208 (1984); Smith, J.R. et al., Exper. Gerontol. 24:377-381 (1989), herein incorporated by reference). Researchers have attempted to clone genes relevant to cellular senescence. A correlation between the existence of an inhibitor of DNA synthesis and the phenomenon of cellular senescence has been recognized (Spiering, A.I. et al., Exper. Cell Res. 179:159-167 (1988); Pereira-Smith, O.M. et al., Exper. Cell Res. 160:297-306 (1985); Drescher-Lincoln, C.K. et al., Exper. Cell Res. 153:208-217 (1984); Drescher-Lincoln, C.K. et al., Exper. Cell Res. 144:455-462 (1983)). Moreover, the relative abundance of certain senescence-associated RNA molecules has been identified (Lumpkin, C.K. et al., Science 232:393-395 (1986)).

Several laboratories have used the "subtraction-differential" screening method to identify cDNA molecules derived from RNA species that are preferentially present in senescent cells (Kleinsek, D.A., Age 12:55-60 (1989); Giordano, T. et al., Exper. Cell Res. 185:399-406 (1989); Sierra, F. et al., Molec. Cell Biol. 9:5610-5616 (1989); Pereira-Smith, O.M. et al., J Cell. Biochem. (Suppl 0 (12 part A)) 193 (1988); Kleinsek, D.A., Smith, J.R., Age 10:125 (1987)).

In one method, termed "subtraction-differential" screening, a pool of cDNA molecules is created from senescent cells, and then hybridized to cDNA or RNA of growing cells in order to "subtract out" those cDNA molecules that are complementary to nucleic acid molecules present in growing cells. Although useful, for certain purposes, the "subtraction-differential" method suffers from the fact that

- 6 -

it is not possible to determine whether a senescence-associated cDNA molecule is associated with the cause of senescence, or is produced as a result of senescence. Indeed, many of the sequences identified in this manner have been found to encode proteins of the extra-cellular matrix. Changes in the expression of such proteins would be unlikely to cause senescence.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention concerns, in part, the observation that normal human cells exhibit a limited replicative potential in vitro and become senescent after a certain number of divisions. As the cells become senescent, they show several morphological and biochemical changes, such as enlargement of cell size, changes of extracellular matrix components, unresponsiveness to mitogen stimulation and failure to express growth regulated genes.

The present invention identifies an inhibitor of DNA synthesis that is produced in senescent cells. This inhibitor plays a crucial role in the expression of the senescent phenotype. The gene coding for the inhibitor was identified by incorporating a senescent cell cDNA library into a mammalian expression vector. The cDNA library was then transfected into young, cycling cells to identify those library members that suppressed the initiation of DNA synthesis.

Efficient DEAE dextran-mediated transfection enabled the isolation of putative senescent cell derived inhibitor (SDI) sequences in three distinct cDNA clones. The expression of one (SDI-1) increased 20 fold at cellular senescence, whereas that of the others (SDI-2 and SDI-3) remained constant.

In summary, the present invention achieves the cloning of an inhibitor of DNA synthesis using a functional assay. This method may be applied to clone other genes involved in negative regulation of the cell cycle, such as tissue specific differentiation and tumor suppression genes. Using this

- 7 -

method, the inhibitor sequences have been cloned. One of these sequences (SDI-1) appears to be closely related to cellular senescence.

5 In detail, the invention provides a nucleic acid molecule that encodes a protein capable of inhibiting DNA synthesis in a recipient cell.

The invention particularly concerns the embodiment wherein the nucleic acid molecule is DNA, and is incorporated into a DNA plasmid (such as pcDSR α Δ).

10 The invention also concerns the embodiments wherein the above stated nucleic acid molecule is SDI-1, and wherein it has the sequence shown in Figure 5 <SEQ ID 1>.

The invention also includes the embodiment wherein the nucleic acid molecule is RNA.

15 The invention also concerns a nucleic acid molecule (either DNA or RNA) having a sequence complementary to such RNA molecule, and a length sufficient to permit the molecules to hybridize to one another under physiological conditions.

20 The invention also provides a method for inhibiting DNA synthesis in a human cell which comprises providing to the cell an effective amount of the above-stated nucleic acid molecule that encodes a protein capable of inhibiting DNA synthesis in a recipient cell (and especially wherein the cell is a tumor cell, or a cell in in vitro culture).

25 The invention also provides a method for derepressing an inhibition of DNA synthesis in a quiescent or senescent human cell which comprises providing to the cell an effective amount of a nucleic acid molecule (either DNA or RNA) having a sequence complementary to an RNA molecule that encodes a protein capable of inhibiting DNA synthesis in a recipient
30 cell, and having a length sufficient to permit the molecules to hybridize to one another under physiological conditions. Especially contemplated is the embodiment wherein the cell is a skin cell or a cell present in wound or burn tissue. The
35 invention further contemplates the use of the agents of the present invention in tissue other than skin, such as lymphocytes, vascular tissue (such as arteries, arterioles,

- 8 -

capillaries, veins, etc.), liver, kidney, heart and other muscle, bone, spleen, etc.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

5 Figure 1 shows the structure of the cDNA cloning and expression vector, pcDSR α Δ (B represents BamHI site).

Figure 2 identifies cDNA clones inhibitory to young cell DNA synthesis. The three different bars represent independent transfection experiments, * indicates not done, a negative number indicates labelling indices higher than the controls.

10 Figure 3 shows antisense SDI cDNA transfection. Antisense cDNA expression plasmids were made and co-transfected with pCMV8 into young cells. Lane 1: control pcDSR α Δ , lane 2: pcDSR α Δ -SDI-1, lane 3: pcDSR α Δ antiSDI-1, lane 4: pcDSR α Δ -SDI-2, lane 5: pcDSR α Δ -antiSDI-2.

15 Figure 4 shows the changes in poly A+ RNA recovery from total RNA during cellular aging.

Figure 5 provides the nucleotide and amino acid sequences of SDI-1 cDNA.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

20 I. Cellular Senescence

Replicative senescence of normal human diploid fibroblasts in culture is a well established and widely accepted model for cellular aging (Hayflick, L., Exp. Cell Res. 37:611-636 (1965); Norwood, T.H., and Smith, J.R., In: 25 Handbook of the Biology of Aging (2nd ed.) C.E. Finch and E.L. Schneider, eds. Van Nostrand, New York pp. 291-311 (1985); Goldstein, S., Science 249:1129-1133 (1990)). After a limited number of population doublings, as cells become senescent, they lose the capability to divide and display a large and 30 flattened morphology. The causative mechanisms underlying this phenomenon are not yet understood, despite the many

- 9 -

observations that characterize senescent cells at the biochemical and molecular levels.

One- and two-dimensional protein gel analyses have revealed that there are few senescent cell-specific marker proteins (Lincoln, D.W. et al., Exp. Cell Res. 154:136-146 (1984); Wang, E., J. Cell Biol. 100:545-551 (1985); Scottie, J. et al., J. Cell Physiol. 131:210-217 (1987); Bayreuther, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:5112-5116 (1988)). Antigenic determinants that specify senescent cells have been found on the plasma membrane (Porter, M.B. et al., J. Cell Physiol. 142:425-433 (1990)). Components of extracellular matrix, such as fibronectin and collagenase, have been found to be over-expressed in senescent cells (West, M.D. et al., Exp. Cell Res. 184:138-147 (1989); Kumazaki, T. et al., Exp. Cell Res. 195:13-19 (1991)). However, the relevance of these observations to cellular senescence is not clear.

Recently, changes in the expression of several growth regulated genes have been identified. Expression of c-fos cdc2, cyclin A and B have been found to be impaired in senescent cells (Seshadri, T., and Campisi, J., Science 247:205-209 (1990)). Similarly, senescent cells evidence an inability to phosphorylate the retinoblastoma protein (Stein, G.H. et al., Science 249:666-669 (1990)). These observations could potentially explain the inability of the cells to enter S phase, since they are all deteriorative changes of growth promoting gene expression, however, it is not clear whether they are the cause or result of senescence.

One additional change in gene expression that could have a causal role in senescence is the inhibitor(s) of DNA synthesis produced by senescent but not young fibroblasts (see, Spiering, A.I. et al., Exper. Cell Res. 195:541-545 (1991)). Evidence for the existence of the inhibitor(s) was first obtained from heterokaryon experiments in which senescent cells inhibited initiation of DNA synthesis in young nuclei within the heterokaryon (Norwood, T.H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71:2231-2234 (1974); Pereira-Smith, O.M., and Smith, J.R., Somat. Cell Genet. 8:731-742 (1982)).

- 10 -

Studies with cybrids involving senescent cytoplasts and whole young cells lent further support for the presence of a surface membrane associated protein inhibitor of DNA synthesis in senescent cells (Drescher-Lincoln, C.K., and Smith, J.R., Exp. Cell Res. 153:208-217 (1984)). This was directly demonstrated when surface membrane enriched preparations from senescent cells or proteins extracted from the membranes were found to inhibit DNA synthesis when added to the culture medium of young cells (Pereira-Smith, O.M. et al., Exp. Cell Res. 160:297-306 (1985); Stein, G.H., and Atkins, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:9030-9034 (1986)). Purification of that inhibitor by biochemical methods has been unsuccessful to date. However, in microinjection experiments, the presence of a high abundance of DNA synthesis inhibitory messenger RNA has been demonstrated (Lumpkin, C.K. et al., Science 232:393-395 (1986)).

In order to attempt to clone the gene(s) coding for the DNA synthesis inhibitor(s), a functional screening procedure was employed. This method led to the isolation and identification of three cDNA species that exhibit DNA synthesis inhibitory activity when introduced into young cycling cells. These molecules are referred to herein as "senescent cell derived inhibitors" ("SDI").

II. The Cloning of Inhibitors of Cellular Senescence

In the practice of the present invention, an efficient method for the molecular cloning of the DNA synthesis inhibitory sequences present in senescent human diploid fibroblasts is preferably employed. As is often the case when attempting to clone biologically important genes, it may not be possible to purify a desired gene responsible for cellular senescence, even though the activity of its products could be readily detected.

One method that might be envisioned for identifying such a gene sequence would be to employ a differential or subtractive screening of a senescent cell derived cDNA

- 11 -

library. This method has been used to identify cDNA molecules that are over expressed in cells from Werner Syndrome patients (Murano, S. et al., Molec. Cell. Biol. 11:3905-3914 (August 1991)). Werner Syndrome is a rare inherited disorder. It is characterized by premature aging. The relevance of Werner Syndrome to natural aging is unknown.

Unfortunately, such screenings would identify a number of genes that, although important for the characterization of senescent cells, would not be primarily responsible for senescence. Furthermore, technical limitations in cloning full-length cDNA make it difficult to determine the function of genes cloned by these methods. For these reasons, such differential methods are neither generally suitable, or the most desirable method of identifying senescence-related gene sequences.

In contrast, expression screening provides a preferred method for identifying and isolating such senescence-related gene sequences. In such a screening method, the cDNA is cloned directly into a vector that is capable of expressing the cloned gene in a recipient cell. The recipient cells can thus be directly screened for any inhibition in DNA synthesis.

In expression screening, the most important step is the synthesis of cDNAs. Enzymes should be carefully chosen to be free of impurities. The cDNA synthesis is preferably repeated several times to ensure that satisfactory results (i.e. faithful reverse transcription, and full length transcript size) will be obtained. Finally, the cDNA products are preferably size fractionated to eliminate fragmented and prematurely terminated cDNA products. Double stranded cDNA products are then preferably divided into fractions based on size, i.e., 0.5-2.0, 2.0-4.5, and 4.5-10 kb fractions. The 2-4.5kb cDNA fraction was used to make the cDNA library on the assumption that many membrane associated proteins have a relatively high molecular weight. The cDNAs are inserted into a suitable expression vector, preferably pCDSR $\alpha\Delta$, in which the inserted sequences can be transcribed at high levels in young cells.

- 12 -

The most preferred transfection procedure is DEAE dextran-mediated transfection, carried out under conditions that allowed for transient expression in a high percentage of young cycling cells. Since the transfection frequencies could vary from experiment to experiment, the cDNA pool plasmids were transfected along with a marker plasmid, such as pCMVB (encoding β -galactosidase), and the labelling index was assayed in only β -galactosidase positive cells. Generally, co-expression of transfected genes is quite high, since transfection competent cells will accept multiple plasmids. This simple co-transfection method enabled the evaluation of DNA synthesis in cells expressing exogenous DNA.

The amount of plasmid to be co-transfected was determined from pilot experiments. When the correlation between the transfection frequency and the amount of plasmid added is examined using a marker plasmid, maximum efficiency is obtained at a range of 100-500 ng of plasmid. Taking into account this result, the cDNA library is preferably divided into small pools in which every pool contained five independent plasmid clones. Then the co-transfection is carried out with approximately 100 ng of pCMVB and approximately 400 ng of cDNA plasmid. These parameters were found to maximize the co-expression of cDNA in β -galactosidase positive cells without decreasing the transfection frequency of the marker plasmid.

After the second round of screening, single plasmids which showed strong inhibition of DNA synthesis can be successfully isolated from the pool that tested positive during the first round screenings (Figure 2). In Figure 2, cDNA pools which showed positive in the first round screenings were divided into individual plasmid, and transfected again. For every cDNA pool (A, B and C), plasmid No. 1 to 5 represents the result of each single plasmid transfection. In pool B, No. 1 plasmid was found to be only the empty vector. The inhibitory activities of the plasmids are preferably further confirmed by nuclear microinjection experiments. Such experiments provide more direct evidence

- 13 -

that the isolated plasmids contain sequences capable of inhibiting DNA synthesis.

III. The Molecules of the Present Invention and Their Uses

5 The present invention contemplates the use of any of a variety of chemical agents to either inhibit or enable DNA synthesis. Such agents may be: (1) an oligonucleotide, (2) a nucleic acid binding protein, or (3) a compound whose structure mimics that of either an oligonucleotide or a nucleic acid binding molecule (i.e. a "peptidomimetic" agent).

10 The agents of the present invention are capable of either inducing the inhibition of DNA synthesis in active cells, or suppressing such inhibition in senescent or quiescent cells, they may be used for a wide range of therapies and applications.

15 Thus, in one embodiment, the present invention provides a means of isolating cDNA molecules, in functional (i.e. expressible) form, that are capable of inhibiting DNA synthesis in recipient cells. Such "SDI" nucleic acid molecules, as well as the proteins they encode, and their
20 peptidomimetic analogs, have use in inducing a senescent or quiescent state in a recipient cell. Such induction is desirable in the treatment of progeria (Badame, A.J., Arch. Dermatol. 125:540 (1989); Hamer, L. et al., Orthoped. 11:763 (1988); Martin, G.M., Natl. Canc. Inst. Monogr. 60:241 (1982)); age-related disorders (Martin, G.M., Genome 31:390 (1989); Roe, D.A., Clin. Geriatr. Med. 6:319 (1990); Mooradian, A.D., J. Amer. Geriatr. Soc. 36:831 (1988); Alpert, J.S., Amer. J. Cardiol. 65:23j (1990)); Alzheimer's disease (Terry, R.D., Monogr. Pathol. 32:41 (1990); Costall, B. et al., Pharmacopsychiatry 23:85 (1990)); asthenia and cachexia
30 (Verdery, R.B., Geriatrics 45:26 (1990)), or diseases or conditions in which rapid cellular proliferation is undesirable. In this respect, the agents of the present invention can be used therapeutically to suppress the rapid

- 14 -

proliferation of tumor or tumorigenic cells. Thus, the present invention provides a therapy for treating cancer.

The sequence of the SDI nucleic acid molecules permits one to ascribe and identify protein molecules that can be used to suppress the inhibition of DNA synthesis associated with quiescence and senescence. The amino acid sequence of such molecules can be readily derived from the known relationship between the nucleotide sequence of a nucleic acid molecule, and the amino acid sequence of the protein it encodes. The present invention includes the protein and polypeptide molecules that would be synthesized through the transcription and translation of the disclosed SDI nucleic acid molecules.

An additional class of molecules that is contemplated by the present invention comprises proteins or other molecules (i.e. peptidomimetic analogs) that mimic the function of the proteins expressed from the SDI sequences.

These and other analogs can be readily identified by, for example, exploiting the capacity of the agents of the present invention to induce or to derepress DNA synthesis may be used to identify agents capable of reversing these processes. Thus, for example, one may incubate cells in the presence of both an SDI oligonucleotide and a suspected antagonist compound. The cells would be monitored in order to determine whether the compound is able to impair the ability of the SDI oligonucleotide to inhibit DNA synthesis. Thus, the present invention includes a "screening assay" capable of identifying antagonists of the SDI oligonucleotides. Conversely, one may incubate cells in the presence of both an SDI antisense oligonucleotide and a suspected antagonist compound. The cells would be monitored in order to determine whether the compound is able to impair the ability of the antisense oligonucleotide to derepress DNA synthesis. Thus, the present invention includes a "screening assay" capable of identifying antagonists of the antisense oligonucleotides. In a similar manner, agonists of these agents may alternatively be identified.

- 15 -

Among the agonist compounds which could be identified through the use of such a screening assay are compounds which could be used to induce infertility. Similarly, the assay will permit the identification of compounds capable of either
5 suppressing or inducing tissue regeneration or vascularization. Such compounds may be useful in the treatment of cancer.

In addition to their use in expressing proteins and polypeptides, and in defining desirable analogs, the SDI
10 nucleic acid molecules of the present invention can be used to produce antisense nucleic acid molecules capable of binding to an SDI nucleic acid molecule and inhibiting its activity, etc. A particularly preferred such agent is antisense oligonucleotide.

15 In general, an "antisense oligonucleotide" is a nucleic acid (either DNA or RNA) whose sequence is complementary to the sequence of a target mRNA molecule (or its corresponding gene) such that it is capable of binding to, or hybridizing with, the mRNA molecule (or the gene), and thereby impairing
20 (i.e. attenuating or preventing) the translation of the mRNA molecule into a gene product. To act as an antisense oligonucleotide, the nucleic acid molecule must be capable of binding to or hybridizing with that portion of target mRNA molecule (or gene) which mediates the translation of the
25 target mRNA. Antisense oligonucleotides are disclosed in European Patent Application Publication Nos. 263,740; 335,451; and 329,882, and in PCT Publication No. WO90/00624, all of which references are incorporated herein by reference.

The present invention is particularly concerned with
30 those antisense oligonucleotides which are capable of binding to or hybridizing with mRNA or cDNA molecules that encode an SDI gene product.

Thus, in one embodiment of this invention, an antisense oligonucleotide that is designed to specifically block
35 translation of an SDI mRNA transcript can be used to de-repress the inhibition of DNA synthesis in a recipient senescent cell.

- 16 -

One manner in which an anti-SDI antisense oligonucleotide may achieve these goals is by having a sequence complementary to that of the translation initiation region of an SDI mRNA and of sufficient length to be able to hybridize to the mRNA transcript of an SDI gene. The size of such an oligomer can
5 be any length that is effective for this purpose. Preferably, the antisense oligonucleotide will be about 10-30 nucleotides in length, most preferably, about 15-24 nucleotides in length.

Alternatively, one may use antisense oligonucleotides
10 that are of a length that is too short to be capable of stably hybridizing to an SDI mRNA under physiologic, in vivo conditions. Such an oligonucleotide may be from about 6-10, or more nucleotides in length. To be used in accordance with the present invention, such an oligonucleotide is preferably
15 modified to permit it to bind to a locus of the translation region of an SDI-encoding mRNA. Examples of such modified molecules include oligonucleotides bound to an antibody (or antibody fragment), or other ligand (such as a divalent crosslinking agent (such as, for example, trimethylpsoralin,
20 8-methoxypsoralin, etc.) capable of binding to a single-stranded SDI mRNA molecules.

An anti-SDI antisense oligonucleotide bound to one reactive group of a divalent crosslinking agent (such as psoralin (for example, trimethylpsoralin, or 8-methoxy-
25 psoralin) adduct would be capable of crosslinking to an SDI mRNA upon activation with 350-420 nm UV light. Thus, by regulating the intensity of such light (as by varying the wattage of the UV lamp, by increasing the distance between the cells and the lamp, etc.) one may control the extent of
30 binding between the antisense oligonucleotide and an SDI mRNA of a cell. This, in turn, permits one to control the degree of attenuation of SDI gene expression in a recipient cell.

In general, the antisense oligomer is prepared in accordance with the nucleotide sequence of an SDI gene, and
35 most preferably in accordance with the nucleotide sequence of SDI-1 (Figure 5).

- 17 -

The sequence of the antisense oligonucleotide may contain one or more insertions, substitutions, or deletions of one or more nucleotides provided that the resulting oligonucleotide is capable of binding to or hybridizing with the above-described translation locus of either an SDI mRNA, cDNA or an SDI gene itself.

Any means known in the art to synthesize the antisense oligonucleotides of the present invention may be used (Zamechik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 83:4143 (1986); Goodchild et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:5507 (1988); Wickstrom et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:1028; Holt, J.T. et al., Mol. Cell. Biol. 8:963 (1988); Gerwitz, A.M. et al., Science 242:1303 (1988); Anfossi, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:3379 (1989); Becker, D., et al., EMBO J. 8:3679 (1989); all of which references are incorporated herein by reference). Automated nucleic acid synthesizers may be employed for this purpose. In addition, desired nucleotides of any sequence can be obtained from any commercial supplier of such custom molecules.

Most preferably, the antisense oligonucleotides of the present invention may be prepared using solid phase "phosphoramidite synthesis." The synthesis is performed with the growing nucleotide chain attached to a solid support derivatized with the nucleotide which will be the 3'-hydroxyl end of the oligonucleotide. The method involves the cyclical synthesis of DNA using monomer units whose 5'-hydroxyl group is blocked (preferably with a 5'-DMT (dimethoxytrityl) group), and whose amino groups are blocked with either a benzoyl group (for the amino groups of cytosine and adenosine) or an isobutyryl group (to protect guanosine). Methods for producing such derivatives are well known in the art.

The antisense and other inhibitor molecules of the present invention may be used to immortalize valuable cell types (such as primary tissue culture cells, tc.) which would otherwise have a transient period of proliferative viability. They may thus be used for research or to permit or facilitate

- 18 -

the accumulation of large numbers of cells, as for organ or tissue grafts or transplants. In one embodiment, therefore, the agents of the present invention may be used in conjunction with methods for organ or tissue culture to facilitate such methods.

A use is said to be therapeutic if it alters a physiologic condition. A non-therapeutic use is one which alters the appearance of a user.

The agents of the present invention may be used topically or systemically for a therapeutic or non-therapeutic purpose, such as, for example, to counter the effects of aging, for example on skin tone, color, texture, etc., or on the degeneration of cells, tissue or organs, such as lymphocytes, vascular tissue (such as arteries, arterioles, capillaries, veins, etc.), liver, kidney, heart and other muscle, bone, spleen, etc. The agents of the present invention may be employed to rejuvenate such cells, tissue or organs. Thus, they may be used in pharmaceuticals, and the like, which may comprise, for example, an antisense oligonucleotide, or its equivalent, and a lipophilic carrier or adjunct, preferably dissolved in an appropriate solvent. Such a solvent may be, for example, a water-ethanol mixture (containing 10% to 30% v/v or more ethanol. Such preparations may contain 0.001% to 1.0% of the antisense oligonucleotide. Suitable carriers, adjuncts and solvents are described in Remington's Pharmaceutical Sciences (16th ed., Osol, A., Ed., Mack, Easton PA (1980), which reference is incorporated herein by reference).

Since the antisense and other inhibitor molecules of the present invention are capable of stimulating cellular proliferation, they may be used to promote wound healing, recovery from burns, or after surgery, or to restore atrophied tissue, etc. For such an embodiment, these agents may be formulated with antibiotics, anti-fungal agents, or the like, for topical or systemic administration.

Such antisense and other inhibitor molecules of the present invention may be used to stimulate the proliferation

- 19 -

of spermatocytes, or the maturation of oocytes in humans or animals. Thus, the agents of the present invention may be used to increase the fertility of a recipient.

5 The molecules of the present invention may be used to provide gene therapy for recipient patients. In one embodiment, cells or tissue from a patient may be removed from the patient and treated with a molecule of the present invention under conditions sufficient to permit a restoration of an active growing state. In one preferred embodiment of
10 this use, lymphocytes of an individual (such as, for example, an immune compromised individual, such as an AIDS patient, etc., or an immune-competent individual who will serve as a donor of lymphocytes) can be removed and treated with antisense SDI nucleic acids. The administration of these
15 molecules will derepress the lymphocytes. After administration, the lymphocytes are reintroduced into the patient, and have an enhanced ability to combat infection.

The molecules of the present invention are particularly suitable for use in the creation and/or study of animal models
20 for disease or tissue degeneration. Thus, the molecules of the present invention can be used to study effectors of an animal model that is characterized by abnormal aging or cellular degeneration. Similarly, the administration of the SDI molecules (linked, for example to suitable regulatory
25 sequences in order to permit their expression in a recipient cell) can be used to create animal models of aging and of tissue degeneration.

IV. Methods of Administration

The agents of the present invention can be formulated
30 according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions, whereby these materials, or their functional derivatives, are combined in admixture with a pharmaceutically acceptable carrier vehicle. Suitable vehicles and their formulation, inclusive of other human proteins, e.g., human
35 serum albumin, are described, for example, in Remington's

- 20 -

Pharmaceutical Sciences (16th ed., Osol, A., Ed., Mack, Easton PA (1980)). In order to form a pharmaceutically acceptable composition suitable for effective administration, such compositions will contain an effective amount of an antisense oligonucleotide, or its equivalent, or their functional derivatives, together with a suitable amount of carrier vehicle.

Additional pharmaceutical methods may be employed to control the duration of action. Control release preparations may be achieved through the use of polymers to complex or absorb an antisense oligonucleotide, or its equivalent, or their functional derivatives. The controlled delivery may be exercised by selecting appropriate macromolecules (for example polyesters, polyamino acids, polyvinyl, pyrrolidone, ethylenevinylacetate, methylcellulose, carboxymethylcellulose, or protamine, sulfate) and the concentration of macromolecules as well as the methods of incorporation in order to control release. Another possible method to control the duration of action by controlled release preparations is to incorporate an antisense oligonucleotide, or its equivalent, or their functional derivatives, into particles of a polymeric material such as polyesters, polyamino acids, hydrogels, poly(lactic acid) or ethylene vinylacetate copolymers. Alternatively, instead of incorporating these agents into polymeric particles, it is possible to entrap these materials in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatine-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, or in colloidal drug delivery systems, for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nanoparticles, and nanocapsules or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in Remington's Pharmaceutical Sciences (1980).

The compositions of the present invention can also be formulated for administration parenterally by injection, rapid infusion, nasopharyngeal absorption (intranasopharyngeally), dermoabsorption, or orally. The

- 21 -

compositions may alternatively be administered intramuscularly, or intravenously. Compositions for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Carriers, adjuncts or occlusive dressings can be used to increase tissue permeability and enhance antigen absorption. Liquid dosage forms for oral administration may generally comprise a liposome solution containing the liquid dosage form. Suitable forms for suspending liposomes include emulsions, suspensions, solutions, syrups, and elixirs containing inert diluents commonly used in the art, such as purified water. Besides the inert diluents, such compositions can also include wetting agents, emulsifying and suspending agents, or sweetening, flavoring, coloring or perfuming agents.

A composition is said to be "pharmacologically acceptable" if its administration can be tolerated by a recipient patient. Such an agent is said to be administered in a "therapeutically effective amount" if the amount administered is physiologically significant. An agent is physiologically significant if its presence results in a detectable change in the physiology of a recipient patient.

Generally, the dosage needed to provide an effective amount of the composition will vary depending upon such factors as the recipient's age, condition, sex, and extent of disease, if any, and other variables which can be adjusted by one of ordinary skill in the art.

Effective amounts of the compositions of the invention can vary from 0.01-1,000 mg/ml per dose or application, although lesser or greater amounts can be used.

Having now generally described the invention, the same will be more readily understood through reference to the following examples which are provided by way of illustration, and are not intended to be limiting of the present invention, unless specified.

- 22 -

EXAMPLE 1
CREATION OF THE CDNA LIBRARY

A cDNA library was obtained using RNA from normal human neonatal foreskin fibroblasts, such as the cell line HCA2. To do this, the cells were grown in minimal essential medium with either Earle's or Hanks' balanced salt solution supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO or Hyclone). Cells were cultured, and their in vitro life span was determined, under the conditions disclosed by Smith, J.R., and Braunschweiger, K.I., J. Cell Physiol. 98:597-601 (1979), hereby incorporated by reference. Quiescent cells were made by replacing the normal culture medium with culture medium containing 0.5% serum before the cells become confluent. The cells were maintained in low serum culture for up to 3 weeks.

Total cellular RNA was isolated either by the guanidium thiocyanate/CsCl method (Garger, S.J. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 117:835-842 (1983)) or a guanidium thiocyanate/phenol method (Chomczynski, P., and Sacchi, N., Anal. Biochem. 162:156-159 (1987)), RNAzol B, Biotecx Lab. Inc. (TX). Poly A+ RNA was isolated by oligo (dT) cellulose column chromatography (Collaborative Res. MA).

10 µg of the poly A+ RNA derived from senescent cells, as described above, was converted to double stranded cDNAs by using RNase H⁻/MMLV reverse transcriptase according to the instructions of the supplier (BRL, MAD), and blunt-ended by T4 polymerase treatment. The double stranded cDNA preparations were size fractionated by agarose gel electrophoresis, and the 2-4.5 kb fraction isolated, for insertion into an expression vector.

The expression vector used for this purpose was a 3.4 kb plasmid, designated pcDSRαΔ (Figure 1). Plasmid pcDSRαΔ is a derivative of the plasmid pcDSRα296, which includes the Okayama-Berg SV40 promoter and the LTR from HTLV-1 (Takebe, Y. et al., Mol. Cell. Biol. 8:466-472 (1988); provided by Dr. M. Yoshida (Cancer Inst. of Japan)). Plasmid pcDSRαΔ was formed by removing a 336 base pair (bp) segment of the PstI-KpnI fragment of pcDSRα296 and replacing it with 28 bp of a

- 23 -

PstI-KpnI fragment from pUC19. The resulting plasmid (pcDSR α Δ) was used as a cloning and expression vector.

Plasmid pSV2cat (Gorman, C. *et al.*, Mol. Cell. Biol. 2:1044-1051 (1982)) was provided by Dr. Gretchen Darlington (Texas Children's Hospital). The pcD vector (Okayama, H., and Berg, P., Mol. Cell. Biol. 3:280-289 (1983)) was provided by Dr. H. Okayama (Osaka University, Japan); the plasmid has the chloramphenicol acetyltransferase ("CAT") gene inserted between the SV40 promoter and SV40 poly A signal. pcDSR α Δ -cat was constructed from pcDSR α Δ by the insertion of 0.8 Kb of a HindIII-SmaI digested SR α promoter fragment into HindIII digested pSVocat via a two step ligation. A very strong promoter was desired in order to allow for efficient expression screening of the cDNA library. From an analysis of several mammalian expression vectors (pSV2cat, pcD-cat and pcDSR α Δ -cat, transfected into young cells), the SR α promoter was found to drive the expression of the CAT gene at high efficiency in young cycling cells. The relative CAT activities of these plasmids were calculated by normalizing to the amount of protein used for each reaction. The transcriptional efficiency was about 20-fold greater than that of the conventional pSV2 promoter, which utilizes the SV40 early gene promoter.

pcMV8 carries the E. coli β -galactosidase gene driven by the human cytomegalovirus immediate early gene promoter (MacGregor, G.R., and Caskey, C.T., Nucleic Acids Res. 17:2365 (1989); provided by Dr. Grant MacGregor, Baylor College of Medicine, TX). Plasmid p8440, which carries 443 bp of the human β -actin sequence (Nakajima-Iijima, S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 82:6133-6137 (1985); provided by Dr. Kozo Makino, Osaka University, Japan). Plasmid pHcGAP (Tso, J.Y. *et al.*, Nucleic Acids Res. 13:2485-2502 (1985)), which carries a full length human glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA, was obtained from the American Type Culture Collection, Rockville, MD.

- 24 -

For cDNA antisense expression, full length cDNA fragments were excised by BamHI digestion from the originally cloned pcDSR α Δ vector, and re-ligated in the reverse direction.

5 cDNAs recovered from the agarose gel were directly inserted into a calf intestine alkaline phosphatase treated SmaI site of pcDSR α Δ, and transformed into E. coli MC1061 or DH-1. Ampicillin resistant colonies were picked randomly and plasmid sizes determined. These procedures were repeated until 2-4.5 kb cDNA insertions were achieved in more than 90 percent of the plasmids tested. Then each E. coli colony was 10 picked with toothpicks and 5 colonies combined into one cDNA pool. More than 400 cDNA pools were prepared, grown in 96 well microtiter plates and stored in 14% glycerol at -70°C. For DNA isolation, E. coli from each cDNA pool was cultured 15 in 200 ml, and treated by the standard methods of ethidium bromide/CsCl ultracentrifugation (Garger, S.J. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 117:835-842 (1983)) one or two times, followed by dialysis against TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) solution.

20

EXAMPLE 2
DEAE-DEXTRAN MEDIATED TRANSFECTION AND
TRANSIENT EXPRESSION SCREENING

Young, cycling fibroblast cells were seeded at a density of 0.9-1.2 X 10⁵ per well in 6 well tissue culture plates or 25 35 mm tissue culture dishes 18 h prior to transfection. Transfection was done as described by Cullen, B.R., In: Guide to Molecular Cloning Techniques. Methods in Enzymology., S.L. Berger and A.R. Kimmel (ed.) Academic Press, pp. 684-704 (1987); herein incorporated by reference with minor 30 modifications as described below.

For each transfection, 100 ng of pCMVB and 400 ng of a cDNA pool were mixed and suspended in 190 μl of phosphate buffered saline (PBS) solution and 10 μl of 10 mg/ml of DEAE-dextran (Pharmacia, MW ~500,000) was added. 400 ng of the 35 cloning vector plasmid, pcDSR α Δ, was used with pCMVB as a control. After washing the cells with PBS once, DNA solutions

- 25 -

were added and the cells incubated for up to 45 min at 37°C in a CO₂ incubator. Then 2 ml of cell culture medium with serum, containing 64 µM chloroquine (Sigma, MO) was added directly and incubated for another 2.5 h. After the

5 chloroquine treatment, the transfection mixture was removed and the cells treated with 10% dimethyl sulfoxide in cell culture medium with serum for 2 min. Cells were then returned to fresh cell culture medium with serum and incubated to allow for expression of the transfected DNA.

10 18 h after transfection, 0.5 µCi/ ml of ³H-thymidine was added and the incubation continued for another 48 h. Cells were fixed by adding 25 µl of 25% of glutaraldehyde solution to the culture medium and incubated for 5 min at room temperature, followed by three washings with PBS. Immediately

15 after washing, cells were treated with the X-gal reaction mixture (1 mM MgCl₂, 3 mM K₄[Fe(CN)₆], 3 mM K₃[Fe(CN)₆], 0.1% triton X-100, and 1 mM X-gal dissolved in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 10 mM KCl) for up to 20 min to allow light-blue staining of the cells. After the X-

20 gal staining, the cells were washed with water, dried and processed for autoradiography using Kodak NTB nuclear track emulsion (Kodak, NY). DNA synthesis activity in X-gal positive cells was then determined. The percent inhibition of DNA synthesis was calculated using the formula:

$$25 \quad \frac{\% \text{ labeled nuclei in blue cells in which control plasmids were transfected} - \% \text{ labeled nuclei in blue cells in which cDNA plasmids were transfected}}{\% \text{ labeled nuclei in blue cells in which control plasmids were transfected}} \times 100$$

% labeled nuclei in blue cells in which control plasmids were transfected

30 Candidate cDNA pools were divided into individual cDNAs and screened further for the identification of specific DNA synthesis inhibitory cDNA sequences.

Nuclear microinjection of young cycling cells was performed as described by (Lumpkin, C.K. et al., Mol. Cell Biol. 6:2990-2993 (1986), herein incorporated by reference).

35 Bri fly, 5,000 - 10,000 cells were plated onto 22 mm square etched grid coverslips (Bellco) in 35 mm tissue culture dishes. Three or four days later, nuclear microinj ctions

- 26 -

were performed on a minimum of 300 cells, using either pCMVB + cDNA plasmid or pCMVB + pcDSR α Δ (which served as the control). Plasmids were co-microinjected at a concentration of 50 ng/ μ l each. 18 hours after microinjection, the cells
5 were labeled with 3 H-thymidine for 24 h, fixed, stained with X-gal and processed for autoradiography. The percent inhibition of DNA synthesis was calculated as above.

Northern blot analysis was performed using either 5 μ g of total RNA or 1 μ g poly A+ RNA. The RNA was size
10 fractionated by electrophoresis on formaldehyde-agarose gels and transferred to nylon membranes (ICN; Biotrans, formerly Pall Biodyne A) as described by Maniatis, T. et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982), herein incorporated by
15 reference. Radioactive probes were prepared by the random primer method, and blots hybridized as described by Maniatis, T. et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982).

The northern blot analyses revealed that the sizes of the
20 cellular transcripts of the SDIs were compatible with the sizes of the SDI cDNAs. This was expected since successful expression screening requires full-length cDNA insertions into the vector.

For rehybridization with β -actin or glyceraldehyde
25 phosphate dehydrogenase (GAPDH) probe, filters were repeatedly stripped of the labelled probes following the manufacturer's instructions. The data were quantitated by an Ambis Radioanalytic Scanning System.

An assay of CAT activity was determined as follows:
30 Young cycling cells were seeded into 35 mm dishes and 500 ng of plasmid transfected as described above. 24h after the transfection, the cells were scraped from the dish, and CAT assay performed as described by Gorman (Gorman, C., In: DNA Cloning, A Practical Approach. IRL Press, Oxford, England,
35 pp. 143-164 (1985), herein incorporated by reference).

- 27 -

EXAMPLE 3
CDNA CLONING OF THE SENESCENT CELL DERIVED INHIBITORS (SDI)
OF DNA SYNTHESIS

Double stranded cDNAs were synthesized from senescent cell derived poly A⁺ RNA, which has been shown to inhibit DNA synthesis in young cells when microinjected into the cytoplasm (Lumpkin, C.K. *et al.*, Science 232:393-395 (1986)). The cDNAs were size fractionated, inserted into pcDSR α Δ . The resulting *E. coli* clones were divided into small pools. Plasmids from each pool were co-transfected with the transfection marker plasmid, pCMV β , which allowed a determination of the labelling index of transfected cells specifically, since even in high efficiency transfection, frequencies varied from experiment to experiment. Transfection frequencies of the marker plasmid ranged from 30-90%. About 200 cDNA pools were screened and four pools remained positive for DNA synthesis inhibitory activity after five repeated transfections. The candidate pools were then divided into individual plasmids and screened further.

Three independent positive plasmid clones were obtained. In the cDNA pool A, only one plasmid, No. 2, exhibited strong DNA synthesis inhibitory activity. Similarly, in pools B and C only one cDNA clone caused inhibition. The size of inserted cDNAs was 2.1 kb, 1.2 kb and 2.7 kb, respectively. These cDNA sequences have been designated as senescent cell derived inhibitors, SDI-1, SDI-2 and SDI-3, respectively.

The nucleotide sequence of the SDI-1 cDNA clone (SEQ ID NO: 1), and the amino acid sequence of SDI-1 (SEQ ID NO: 2) have been determined. The cDNA sequence presented herein for SDI-1 differs from that described in U.S. patent application serial no. 07/808,523 in possessing an unrecited G at position 286, and in having the sequence CG rather than GC at position 1843-1844. The presently disclosed sequence was obtained through the re-sequencing of the pcDSR α Δ -SDI-1 plasmid whose isolation and characteristics were described in U.S. patent application serial no. 07/808,523. *E. coli* DH5 transformed with the pcDSR α Δ -SDI-1 plasmid was deposited with the American

- 28 -

Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, on October 1, 1992, and has been accorded accession number ATCC 69081.

EXAMPLE 4

MICROINJECTION OF SDI SEQUENCES INTO YOUNG CYCLING CELLS

5 In order to verify the functional activity of SDI sequences, microinjections were performed. A plasmid carrying either SDI-1 or SDI-2 was co-microinjected with the marker plasmid into the nuclei of young cycling cells. The labelling index of the resulting blue cells was determined (Table 1).
10 These plasmids showed strong inhibitory activity on DNA synthesis of young cells. For control experiments, the empty vector was co-microinjected with the marker plasmid. This caused slight inhibition when the labelling index was compared with uninjected cells, a phenomenon also observed in
15 transfection experiments. Microinjections with SDI-3 were not performed because the inhibitory activity was lower than SD-I and SD-2 transfection experiments.

Table 1: Microinjection of Various Plasmids Into Young Cycling Cells

Exp.	Plasmids Injected	No. of Cells Injected	No. of Labelled Nuclei Per Total Blue Cells*	Labelling Index (%)	% Inhibition
Exp. 1	pcMV β +pcDSRa Δ †	335	58/97	59.8	0
	pcMV β +SDI-1	380	20/89	22.5	62.4
	pcMV β +SDI-2	380	6/82	7.3	87.8
Exp. 2	pcMV β +pcDSRa Δ †	423	68/109	62.3	0
	pcMV β +SDI-1	465	26/98	26.5	57.5
	pcMV β +SDI-2	475	27/118	22.9	63.2

† Control

* This is the number of cells expressing detectable levels of β -galactosidase.
 The concentration of each DNA was 50 μ g/ml.

15 EXAMPLE 6
EXPRESSION OF SDI mRNA DURING CELLULAR SENESCENCE

To examine the changes in SDI mRNA expression during cellular senescence, total RNA from young and senescent cells was hybridized to ³²P-labelled SDI cDNA probes. The SDI-1 probe hybridized to a 2.1 kb cellular transcript, SDI-2 hybridized to a 1.4 kb transcript, and SDI-3 hybridized to a 2.5 kb transcript (Table 2). Table 2 provides a quantitation of the total RNA northern analysis of expression of SDI genes in young (Y) and senescent (S) cells. 5 µg each of total RNA from young and senescent cells were hybridized with SDI probes. The filters were repeatedly stripped of the radioactive probe and rehybridized with the probes for the internal controls. The relative amount of SDI mRNA in each sample was normalized by the amount of GAPDH detected on the same filter and by the relative amount of SDI/GAPDH.

- 31 -

Table 2: Quantitation of the Northern Analysis						
ATTRIBUTE	SDI-1		SDI-2		SDI-3	
	Y	S	Y	S	Y	S
Relative Amount of SDI	1.0	3.3	1.0	0.31	1.0	0.31
Relative Amount of GAPDH	1.0	0.37	1.0	0.36	1.0	0.38
Relative Amount of SDI / GAPDH	1.0	9.3	1.0	0.86	1.0	0.82

During cellular senescence, the SDI-1 message increased about 3-fold, while SDI-2 and SDI-3 messages decreased 3-fold. The same filters were rehybridized with a β -actin, and then to a GAPDH probe as internal controls. The results demonstrated that expression of both control genes decreased about 3-fold during cellular senescence. In previous studies, a 2-3 fold decrease of β -actin expression during cellular senescence had been observed (Kumazaki, T. *et al.*, Exp. Cell Res. **195**:13-19 (1991); Seshadri, T., and Campisi, J., Science **247**:205-209 (1990); Furth, J.J., J. Gerontol. **46**:B122-124 (1991)). The decreased expression of both β -actin and GAPDH genes in senescent cells led to the use of poly A⁺ RNA for northern analysis. Poly A⁺ RNA was isolated from the total cellular RNA preparations used for Table 2, and hybridized to SDI cDNA, followed by probing with β -actin and GAPDH respectively (Table 3). Table 3 discloses the results of a poly A⁺ RNA Northern analysis of SDI gene expression in young (Y) and senescent (S) cells. 1 μ g each of poly A⁺ RNA from young and senescent cells were used for the analyses. The relative amount of SDI mRNA in each sample was calculated as in Table 2.

Table 3: Quantitation of the Northern Analysis						
ATTRIBUTE	SDI-1		SDI-2		SDI-3	
	Y	S	Y	S	Y	S
Relative Amount of GAPDH	1.0	0.83	1.0	0.87	1.0	0.87
Relative Amount of SDI / GAPDH	1.0	11.4	1.0	1.0	1.0	1.0

- 32 -

The results clearly indicated that the expression of both β -actin and GAPDH was equal in young and senescent cells when they were compared on the basis of mRNA, consistent with previous observations. When SDI gene expression was compared at the mRNA level, SDI-1 mRNA was increased 11-fold in senescent cells, whereas expression of SDI-2 and SDI-3 remained constant throughout the in vitro lifespan (Table 3). This result suggests that SDI-1 is a senescent cell specific inhibitor of DNA synthesis, whereas SDI-2 and SDI-3 are most likely more general inhibitors involved in cell cycle regulation.

EXAMPLE 7

CHANGES OF POLY A RNA CONTENT DURING CELLULAR SENESENCE

The observation that the results of the total versus poly A+ RNA northern analyses were quantitatively different, indicated that the poly A+ RNA content in total RNA preparations might change during cellular senescence. To test this hypothesis, cells were cultivated serially and total RNA was harvested at different population doubling levels. Poly A+ RNA was isolated from each sample.

The result clearly indicated that poly A+ RNA content decreased gradually during cellular senescence (Figure 4). In figure 4, cells were cultivated serially and total RNA was harvested. Poly A+ RNA: % of total RNA was plotted against the culture's age (% in vitro life span completed). Senescent cells had 3-4 fold less poly A+ RNA when compared with very young cells. However, when total RNA content per cell was calculated, senescent cells had 1.3-1.5 fold more than young cells (see, Cristofalo, V.J., and Kritchevsky, D., Med. Exp. 19:313-320 (1969)).

In order to determine whether SDI-1 message increased gradually during subcultivation or whether a rapid increase occurred near the end of the in vitro life span, poly A+ RNA from cultures at different population doublings was hybridized with the ^{32}P labelled SDI-1 probe. This analysis revealed that SDI-1 expression increased as the cultures became

- 33 -

senescent, with a major change occurring during the final few passag s (Table 4). Table 4 shows the accumulation of SDI-1 mRNA during cellular aging process. 1 μ g each of poly A+ RNA from the cells of different population doublings were
 5 hybridized to SDI-1 probe. The relative amount of SDI-1 mRNA in each sample was calculated as in Table 2.

10

Table 4: Quantitation of % Lifespan Completed							
ATTRIBUTE	24%	37%	46%	66%	78%	88%	100%
Relative Amount of GAPDH	1.0	1.6	1.5	1.3	1.4	1.3	0.9
Relative Amount of SDI / GAPDH	1.0	2.2	2.1	4.0	3.5	6.2	20.5

15

20

25

Changes in SDI-1 expression during quiescence were also examined. Young, quiescent cells were maintained in 0.5% fetal bovine serum (FBS)-containing medium for up to three weeks. Total RNA was harvested each week and the amount of RNA hybridizing to the SDI-1 probe was analyzed. SDI-1 message increased significantly during cellular quiescence (Table 5). Table 5 shows the accumulation of SDI-1 mRNA during cellular quiescence. 4 μ g each of total RNA was obtained from the young cells cultured with 0.5% FBS containing medium for 1, 2, 3 weeks, was hybridized with SDI-1 probe. The relative amount of SDI-1 mRNA was calculated as in Table 2 (C: control culture with 10% FBS medium). When the result was normalized to GAPDH expression, SDI-1 expression was found to have increased 18-fold after two weeks in low serum medium compared to that of a control dividing culture in 10% FBS medium.

30

Table 5: Accumulation of SDI-1 mRNA During Cellular Quiescence				
ATTRIBUTE	C	1 wk	2 wk	3 wk
Relative Amount of GAPDH	1.0	0.72	0.88	0.37
Relative Amount of SDI / GAPDH	1.0	12.2	18.4	14.9

- 34 -

The fact that the cellular representation of mRNA vs total RNA was found to change during cellular senescence is significant. During the in vitro aging process, the content of mRNA was found to decrease gradually (Figure 4), in spite of the slight increase of the total RNA per cell. This phenomenon indicates that a gradual decline of the overall gene expressions during the cellular aging process, and explains the decreased expression of β -actin and GAPDH genes in senescent cells when Northern blot analysis was done with total RNA (Table 2). However, the expression levels of these housekeeping genes between young and senescent cells were almost constant when the Northern blot analysis was done with poly A+ RNAs (Table 3). This analysis revealed the strong expression of SDI-1 message in senescent cells, and unchanging expression of SDI-2 and 3 genes throughout the in vitro life span.

EXAMPLE 8 THE SDI-1 GENE

The SDI-1 gene codes for a senescent cell specific inhibitor of DNA synthesis. Increased expression of this gene occurred when the cells entered their final few divisions (Table 4). The expression kinetics correlated well with the phenotypic expression of senescence cells. SDI-1 gene expression was also found to increase after young cells were made quiescent and nondividing by serum deprivation (Table 5). This result demonstrates the involvement of this gene in the inhibition of DNA synthesis of cellular quiescence as well as senescence. Cells made quiescent by deprivation of serum growth factors have been shown to produce an inhibitor of DNA synthesis with characteristics similar to the inhibitor from senescent cells (Pereira-Smith, O.M. et al., Exp. Cell Res. 160:297-306 (1985); Stein, G.H., and Atkins, L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:9030-9034 (1986)).

The fact that SDI-1 expression increases during both senescence and quiescence indicates that it is an inhibitor of DNA synthesis (Smith, J.R., J. Gerontol. 45:B32-35 (1990);

- 35 -

herein incorporated by reference). Alternatively, SDI-1 sequences might be related to the growth arrest-specific genes recently cloned from mouse cells (Schneider, C. et al., Cell 54:787-793 (1988); Manfioletti, G. et al., Mol. Cell. Biol. 10:2924-2930 (1990)).

EXAMPLE 9
THE EXPRESSION OF THE SDI-1 GENE PRODUCT

SDI-1 cDNA has been expressed in two different bacterial expression systems, has been transcribed in vitro and translated in two different in vitro systems. Two bacterial expression systems were used in order to maximize the probability of obtaining sufficient amounts of SDI-1 protein. In the first expression system, SDI-1 protein was expressed as a glutathione S-transferase fusion protein at yields of 5-10 µg per liter of bacterial culture. The recombinant protein could be cleaved with thrombin and purified in order to give an SDI-1 protein with a few extra amino acids. In the second expression system, a 6 histidine amino terminal tag was utilized in order to aid in purification. This recombinant protein may be used without further modification. Both systems permitted the isolation of pure preparations of protein.

In the course of this experiment, in vitro transcription and translation systems were used to confirm the open reading frame deduced from the nucleic acid sequence of the SDI-1 cDNA. The calculated molecular weight of the SDI-1 protein is approximately 16,000 daltons. The in vitro synthesized protein migrates, by SDS PAGE, with a relative mobility of approximately 21,000 daltons. This small difference may be due to a slightly unusual charge or conformation of the SDI-1 protein. A partial amino acid sequence of the bacterially expressed protein verified the open reading frame (SEQ ID NO:2).

The bacterially expressed proteins were used to generate polyclonal antisera and monoclonal antibodies to the intact native protein. Such antibodies may be more effective in immunoprecipitation of SDI-1 protein and SDI-1 protein

- 36 -

complexes than the antisera produced from synthetic peptides. Preliminary immunocytochemical studies, using an antisera of highest affinity (antisera #55) which reacted strongly with the fusion protein on a western transfer at a 1:20,000 dilution, suggested that the SDI-1 protein was relatively abundant in senescent cells compared to dividing young cells. In senescent cells the location appears to be perinuclear, whereas in young cells there appears to be a small amount of SDI-1 protein located in the nucleus. In order to obtain specific staining it was necessary to pre-absorb the antisera against a fixed cell monolayer of cells which do not express detectable levels of SDI-1 mRNA (TE85). The cells were fixed with 4% paraformaldehyde followed by methanol.

In order to study the cellular phenotype resulting from the induced expression of SDI-1 mRNA in cells which normally express the gene at low levels and to examine the effect of antisense SDI-1 constructs it is desirable to obtain cell lines in which the SDI-1 gene is stably integrated under the control of an inducible promoter. Toward this goal, a functional vector containing SDI-1 under the control of the metallothionine promoter was constructed. Following transfection of this construct into young proliferation competent cells and incubation in the presence of 100 μ M zinc chloride and 2 μ M cadmium chloride, initiation of DNA synthesis was inhibited by about 50%. In the absence of metals there was no inhibition of DNA synthesis. The inhibitory activity observed is not due to metal toxicity since cells transfected with the control vector (pcDSR α) and grown in the presence of metals were found to have approximately 90% of the DNA synthetic capacity of cells transfected with the same plasmid grown in the absence of metals.

In order to demonstrate that the inhibitory effects observed with SDI-1 were not related to the nature of the specific promoter used to drive expression, the capacity of SDI-1, expressed from other promoters, to inhibit DNA synthesis was investigated. Young proliferating human

- 37 -

fibroblasts were therefore co-transfected with CMV- β -gal and CMV-SDI-1. Transfection of cells with CMV- β -gal had little effect on DNA synthesis while CMV-SDI-1 was even more effective than SDI-1 in the pcDSR α vector in these particular experiments.

5 The SV40 large T antigen is capable of inducing senescent cells to synthesize DNA. It was therefore of interest to determine whether the inhibitory action of SDI-1 could be overcome by the expression of T antigen. Moreover, it was
10 desirable to determine that the action of SDI-1 was not due to the induction of a general metabolic imbalance in cells. If such were the case, one would not expect large T antigen to antagonize its effect. For these reasons, cells were co-transfected with SDI-1 cDNA and vectors in which T antigen was
15 driven by the CMV promoter. Such co-transfection experiments revealed that the inhibitory activity of SDI-1 was largely abolished by the co-expression of the SV40 large T antigen.

Transient transfection assays were performed using an additional normal human fibroblast cell line (neonatal
20 foreskin cell line (CSC303) and the WI38 immortal cell line in order to determine the generality of the inhibitory effect of SDI-1. In both cases, significant inhibition (40-50%) was observed. Furthermore, SDI-1 was found to inhibit SUSMI (40%) but not an SV40 transformed cell line GM639 or HeLa cells (<
25 20%). The results thus far are consistent with earlier results obtained from heterokaryon experiments in which HeLa cells and cells transformed with SV40 virus were not inhibited by fusion with senescent cells. This provides further
evidence that SDI-1 behaves like the inhibitor previously
30 detected in senescent cells.

EXAMPLE 10 SOUTHERN ANALYSIS OF THE SDI-1 GENE

In order to determine whether the absence or inactivity of SDI-1 was responsible for cellular immortality in any of
35 the four complementation groups for indefinite division, genomic DNA and mRNA was examined from cell lines

- 38 -

representative of the four groups. Southern analysis revealed the expected 5 and 10 kb bands after digestion with Eco RI. Therefore, no gross deletions or rearrangements have occurred in the SDI-1 gene in these cell lines. By Northern analysis, it was determined that SDI-1 mRNA was lower or absent in the cell lines that had been assigned to complementation groups B and C. SDI-1 was present at higher levels in cell lines representative of complementation groups A and D. This results suggests that part of the mechanism by which the cell lines may have escaped cellular senescence is through the loss of ability to express sufficient levels of the active SDI-1 gene.

While the invention has been described in connection with specific embodiments thereof, it will be understood that it is capable of further modifications and this application is intended to cover any variations, uses, or adaptations of the invention following, in general, the principles of the invention and including such departures from the present disclosure as come within known or customary practice within the art to which the invention pertains and as may be applied to the essential features hereinbefore set forth and as follows in the scope of the appended claims.

- 39 -

SEQUENCE LISTING

(1) GENERAL INFORMATION:

- (i) APPLICANT: BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE
- (ii) TITLE OF INVENTION: SENESCENT CELL DERIVED
INHIBITORS OF DNA SYNTHESIS
- (iii) NUMBER OF SEQUENCES: 2
- (iv) CORRESPONDENCE ADDRESS:
(A) ADDRESSEE: WEIL, GOTSHAL & MANGES
(B) STREET: 1615 L STREET, N.W.
(C) CITY: WASHINGTON
(D) STATE: D.C.
(E) COUNTRY: USA
(F) ZIP: 20036
- (v) COMPUTER READABLE FORM:
(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) CURRENT APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER:
(B) FILING DATE:
(C) CLASSIFICATION:
- (vii) PRIOR APPLICATION DATA:
(A) APPLICATION NUMBER: US 07/808,523
(B) FILING DATE: 16-DEC-1991
- (viii) ATTORNEY/AGENT INFORMATION:
(A) NAME: AUERBACH, JEFFREY I.
(B) REGISTRATION NUMBER: 32,680
(C) REFERENCE/DOCKET NUMBER: 225-102-CIP
- (ix) TELECOMMUNICATION INFORMATION:
(A) TELEPHONE: (202) 682-7033
(B) TELEFAX: (202) 857-0939

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
(A) LENGTH: 2106 base pairs
(B) TYPE: nucleic acid
(C) STRANDEDNESS: single
(D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: cDNA
- (iii) HYPOTHETICAL: NO

- 40 -

(iv) ANTI-SENSE: NO

(vi) ORIGINAL SOURCE:

(A) ORGANISM: Homo sapiens

(G) CELL TYPE: SENESCENT HUMAN CELLS

5

(vii) IMMEDIATE SOURCE:

(A) LIBRARY: SENESCENT CELL DERIVED CDNA LIBRARY

(B) CLONE: SDI-1

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

	CCTGCCGAAG TCAGTTCCTT GTGGAGCCGG AGCTGGGCGC GGATTGCGCG AGGCACCGAG	60
10	GCACTCAGAG GAGGCGCCAT GTCAGAACCG GCTGGGGATG TCCGTCAGAA CCCATGCGGC	120
	AGCAAGGCCT GCCGCGCCT CTTCGGCCCA GTGGACAGCG AGCAGCTGAG CCGCGACTGT	180
	GATGCGCTAA TGGCGGGCTG CATCCAGGAG GCCCGTGAGC GATGGAACCT CGACTTTGTC	240
	ACCGAGACAC CACTGGAGGG TGACTTCGCC TGGGAGCGTG TCGGGGCCT TGGCCTGCCC	300
	AAGCTCTACC TTCCACGGG GCCCGGCGA GGCCGGGATG AGTTGGGAGG AGGCAGGCGG	360
15	CCTGGCACCT CACCTGCTCT GCTGCAGGGG ACAGCAGAGG AAGACCATGT GGACCTGTCA	420
	CTGTCTTGTA CCCTTG TGCC TCGCTCAGGG GAGCAGGCTG AAGGGTCCCC AGGTGGACCT	480
	GGAGACTCTC AGGGTCGAAA ACGGCGGCAG ACCAGCATGA CAGATTTCTA CCACTCCAAA	540
	CGCCGGCTGA TCTTCTCAA GAGGAAGCCC TAATCCGCCC ACAGGAAGCC TGCAGTCCTG	600
	GAAGCGCGAG GGCCTCAAAG GCCCGCTCTA CATCTTCTGC CTTAGTCTCA GTTTGTGTGT	660
20	CTTAATTATT ATTTGTGTTT TAATTAAAC ACCTCCTCAT GTACATACCC TGGCCGCCCC	720
	CTGCCCCCA GCCTCTGGCA TTAGAATTAT TTAACAAAA ACTAGGCGGT TGAATGAGAG	780
	GTTCCTAAGA GTGCTGGGCA TTTTATTTT ATGAAATACT ATTTAAAGCC TCCTCATCCC	840
	GTGTTCTCCT TTTCCTCTCT CCGGAGGTT GGGTGGGCG GCTTCATGCC AGCTACTTCC	900
	TCCTCCCCAC TTGTCCGCTG GGTGGTACCC TCTGGAGGGG TGTGGCTCCT TCCCATCGCT	960
25	GTCACAGGCG GTTATGAAAT TCACCCCTT TCCTGGACAC TCAGACCTGA ATTCTTTTTC	1020
	ATTTGAGAAG TAAACAGATG GCACTTTGAA GGGGCCTCAC CGAGTGGGGG CATCATCAAA	1080
	AACTTTGGAG TCCCTCACC TCCTCTAAGG TTGGGCAGGG TGACCCTGAA GTGAGCACAG	1140
	CCTAGGGCTG AGCTGGGGAC CTGGTACCCT CCTGGCTCTT GATACCCCCC TCTGTCTTGT	1200
	GAAGGCAGGG GGAAGGTGGG GTCCTGGAGC AGACCACCCC GCCTGCCCTC ATGGCCCCCTC	1260
30	TGACCTGCAC TGGGGAGCCC GTCTCAGTGT TGAGCCTTTT CCCTCTTTGG CTCCCCTGTA	1320
	CCTTTTGAGG AGCCCCAGCT ACCCTTCTTC TCCAGCTGGG CTCTGCAATT CCCCTCTGCT	1380
	GCTGTCCCTC CCCCTGTGTC TTTCCTTCA GTACCCTCTC AGCTCCAGGT GGCTCTGAGG	1440
	TGCCTGTCCC ACCCCCACCC CCAGCTCAAT GGAAGGAGG GGAAGGGGAC ACACAAGAAG	1500
	AAGGGCACCC TAGTCTACC TCAGGCAGCT CAAGCAGCGA CCGCCCCCTC CTCTAGCTGT	1560

- 41 -

GGGGGTGAGG GTCCCATGTG GTGGCACAGG CCCCTTGAG TGGGGTTATC TCTGTGTTAG 1620
GGGTATATGA TGGGGGAGTA GATCTTTCTA GGAGGGAGAC ACTGGCCCCT CAAATCGTCC 1680
AGCGACCTTC CTCATCCACC CCATCCCTCC CCAGTTCATT GCACTTTGAT TAGCAGCGGA 1740
ACAAGGAGTC AGACATTTTA AGATGGTGGC AGTAGAGGCT ATGGACAGGG CATGCCACGT 1800
5 GGGCTCATAT GGGGCTGGGA GTAGTTGTCT TTCCTGGCAC TAAGCTTGAG CCCCTGGAGG 1860
CACTGAAGTG CTTAGTGAC TTGGAGTATT GGGGTCTGAC CCCAACACC TTCCAGCTCC 1920
TGTAACATAC TGGCCTGGAC TGTTTTCTCT CGGCTCCCCA TGTGTCCTGG TTCCCGTTTC 1980
TCCACCTAGA CTGTAAACCT CTCGAGGGCA GGGACCACAC CCTGTACTGT TCTGTGTCTT 2040
TCACAGCTCC TCCCACAATG CTGATATACA GCAGGTGCTC AATAACGAT TCTTAGTGAA 2100
10 AAAAAA 2106

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2:

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS:
 (A) LENGTH: 164 amino acids
 (B) TYPE: amino acid
15 (D) TOPOLOGY: linear
- (ii) MOLECULE TYPE: protein
- (iii) HYPOTHETICAL: NO
- (iv) ANTI-SENSE: NO
- (vi) ORIGINAL SOURCE:
20 (A) ORGANISM: HOMO SAPIENS
 (B) STRAIN: SDI-1
- (vii) IMMEDIATE SOURCE:
 (A) LIBRARY: Senescent cell derived cDNA library

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

[illegible]

- 43 -

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A nucleic acid molecule that encodes a protein capable of inhibiting DNA synthesis in a recipient cell.

5 2. The nucleic acid molecule of claim 1 wherein said molecule is DNA, and is incorporated into a DNA plasmid.

3. The nucleic acid molecule of claim 2, wherein said molecule is SDI-1.

4. The nucleic acid molecule of claim 2, wherein said molecule has the sequence shown in Figure 5 <SEQ ID 1>.

10 5. The nucleic acid molecule of claim 3, wherein said plasmid is pcDSR α Δ .

6. The nucleic acid molecule of claim 1 wherein said molecule is RNA.

15 7. A nucleic acid molecule having a sequence complementary to the RNA molecule of claim 6, and a length sufficient to permit said molecules to hybridize to one another under physiological conditions.

8. The nucleic acid molecule of claim 7 which is an RNA molecule.

20 9. The nucleic acid molecule of claim 7 which is an DNA molecule.

25 10. A method for inhibiting DNA synthesis in a human cell which comprises providing to said cell an effective amount of a nucleic acid molecule that encodes a protein capable of inhibiting DNA synthesis in a recipient cell.

- 44 -

11. The method of claim 10, wherein said cell is a tumor cell.

12. The method of claim 10, wherein said cell is a cell in in vitro culture.

5 13. A method for derepressing an inhibition of DNA synthesis in a quiescent or senescent human cell which comprises providing to said cell an effective amount of a nucleic acid molecule having a sequence complementary to an RNA molecule that encodes a protein capable of inhibiting DNA
10 synthesis in a recipient cell, and having a length sufficient to permit said nucleic acid molecule and said RNA molecule to hybridize to one another under physiological conditions.

14. The method of claim 13, wherein said cell is a skin cell.

15 15. The method of claim 13, wherein said cell is present in wound or burn tissue.

1/9

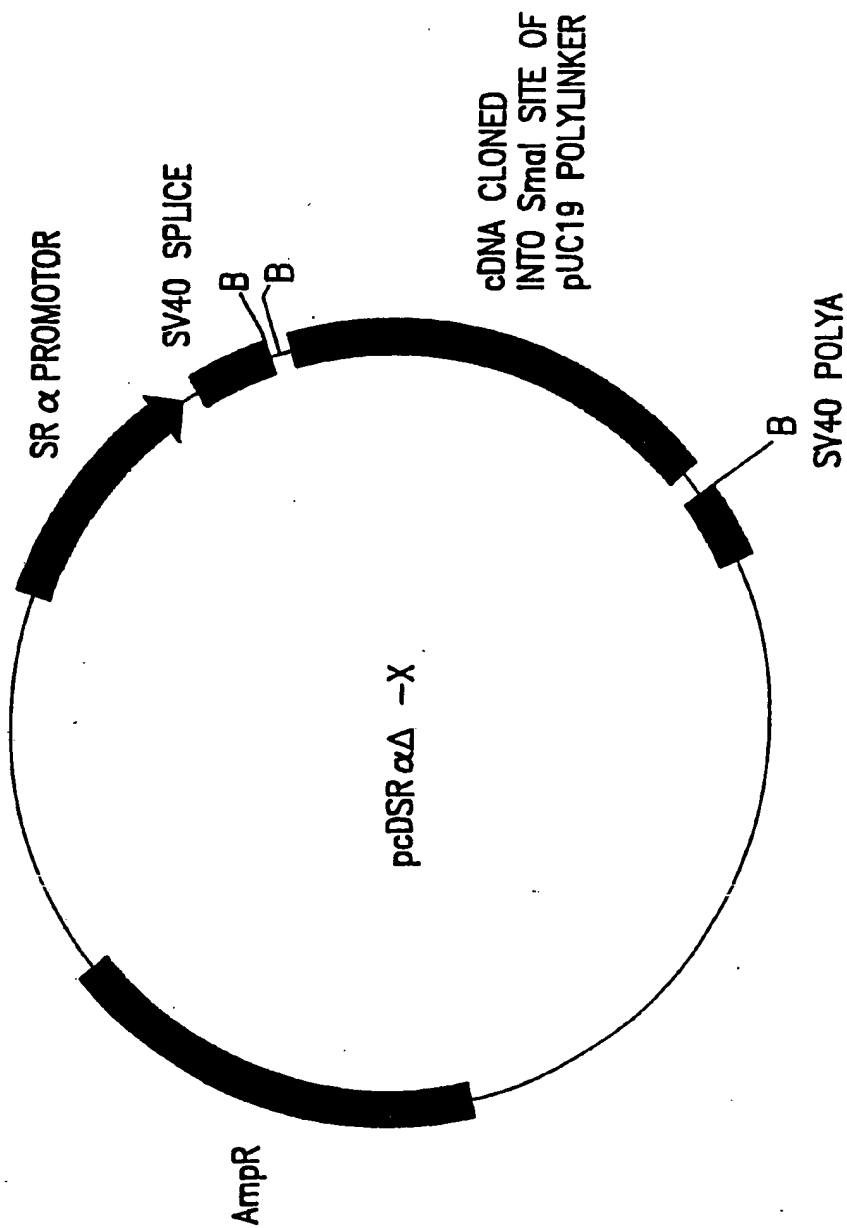


FIG.1

SUBSTITUTE SHEET

2/9

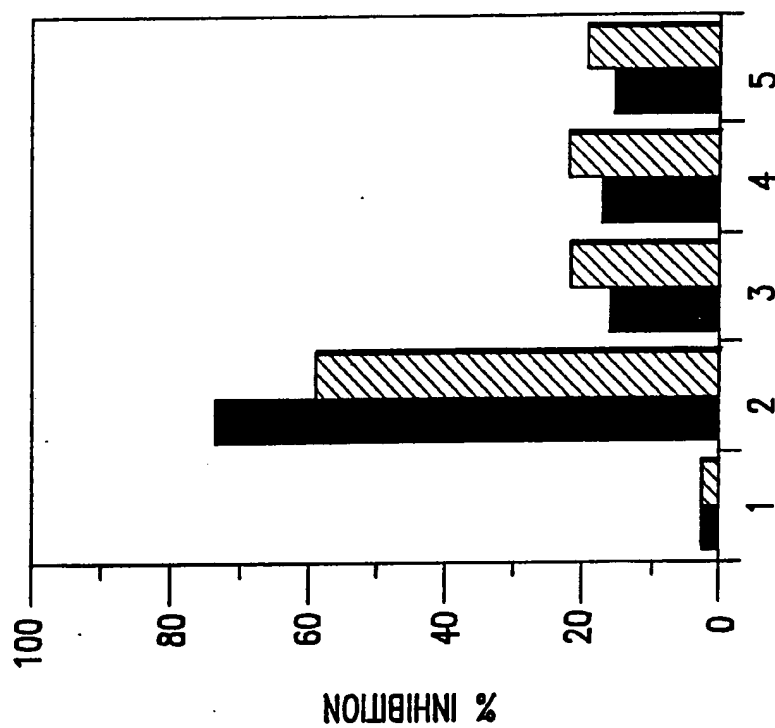


FIG. 2B

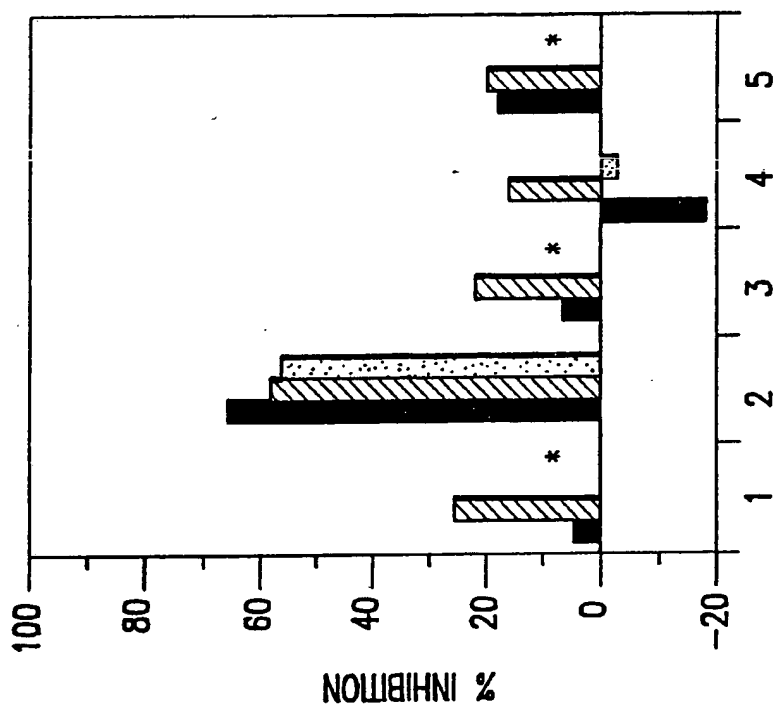


FIG. 2A

3 / 9

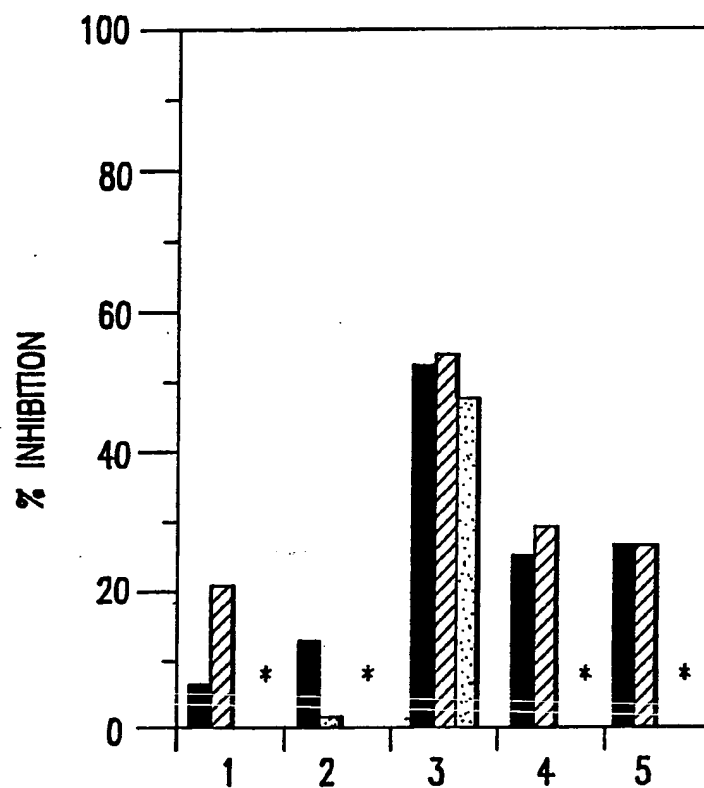


FIG. 2C

SUBSTITUTE SHEET

4/9

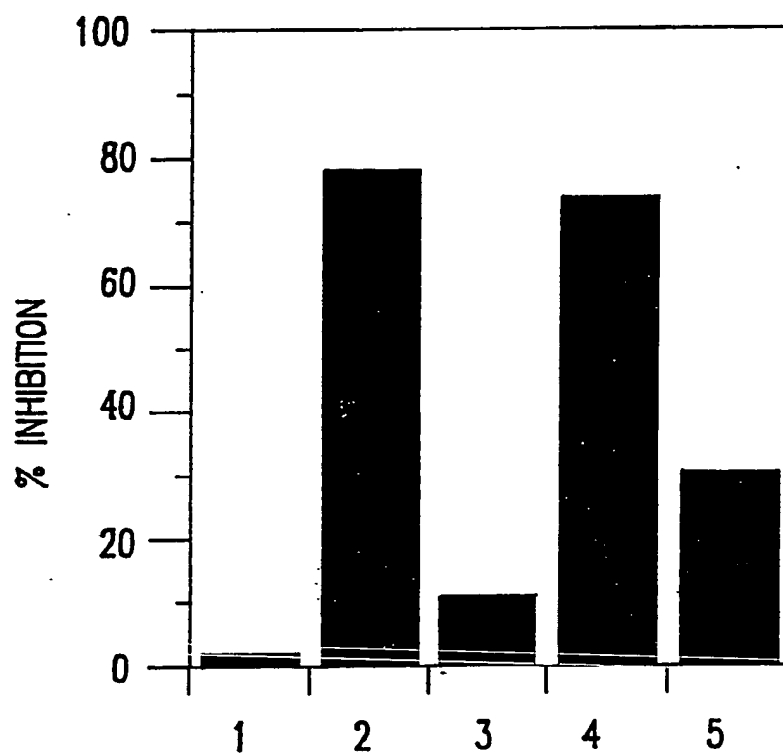


FIG. 3

5/9

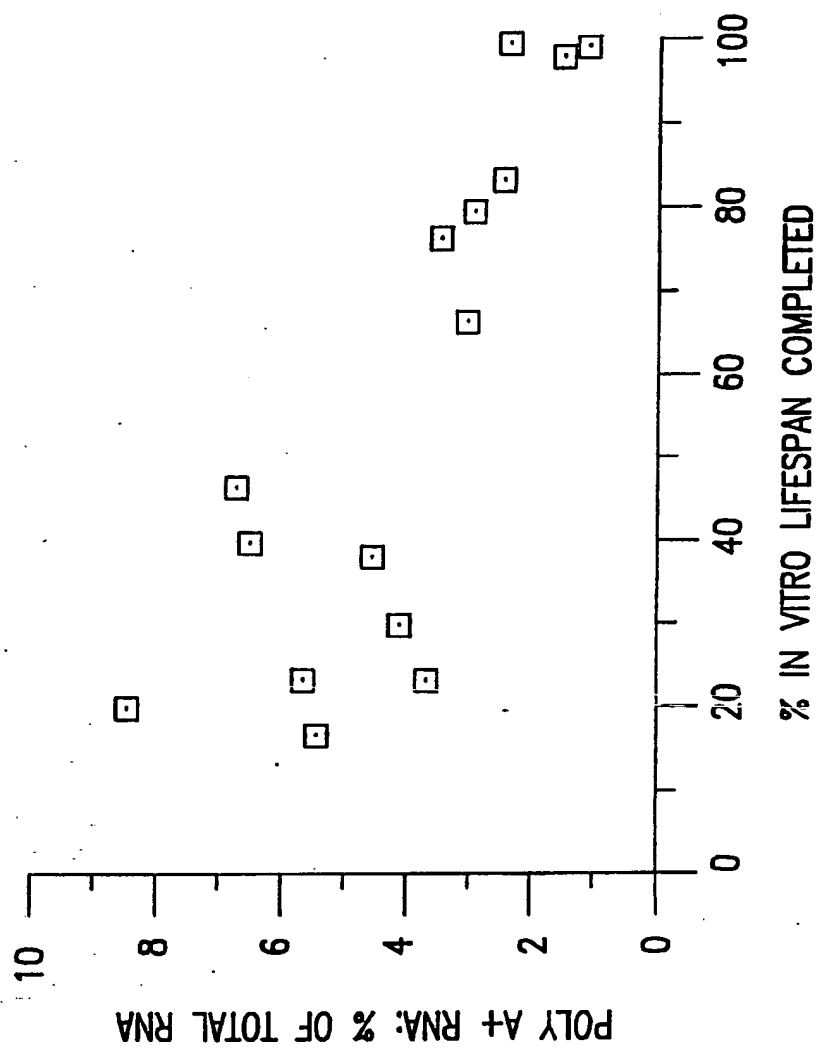


FIG.4

6/9

1: cct gcc gaa gtc agt tcc ttg tgg agc cgg agc tgg gcg cgg att
46: cgc cga ggc acc gag gca ctc aga gga ggc gcc atg tca gaa ccg
M S E P
91: gct ggg gat gtc cgt cag aac cca tgc ggc agc aag gcc tgc cgc
1: A G D V R Q N P C G S K A C R
136: cgc ctc ttc ggc cca gtg gac agc gag cag ctg agc cgc gac tgt
1: R L F G P V D S E Q L S R D C
181: gat gcg cta atg gcg ggc tgc atc cag gag gcc cgt gag cga tgg
1: D A L M A G C I Q E A R E R W
226: aac ttc gac ttt gtc acc gag aca cca ctg gag ggt gac ttc gcc
1: N F D F V T E T P L E G D F A
271: tgg gag cgt gtg cgg ggc ctt ggc ctg ccc aag ctc tac ctt ccc
1: W E R V R G L G L P K L Y L P
316: acg ggg ccc cgg cga ggc cgg gat gag ttg gga gga ggc agg cgg
1: T G P R R G R D E L G G G R R
361: cct ggc acc tca cct gct ctg ctg cag ggg aca gca gag gaa gac
1: P G T S P A L L Q G T A E E D
406: cat gtg gac ctg tca ctg tct tgt acc ctt gtg cct cgc tca ggg
1: H V D L S L S C T L V P R S G

FIG.5A

SUBSTITUTE SHEET

7/9

451: gag cag gct gaa ggg tcc cca ggt gga cct gga gac tct cag ggt
1: E Q A E G S P G G P G D S Q G

496: cga aaa cgg cgg cag acc agc atg aca gat ttc tac cac tcc aaa
1: R K R R Q T S M T D F Y H S K

541: cgc cgg ctg atc ttc tcc aag agg aag ccc taa tcc gcc cac agg
1: R R L I F S K R K P Q

586: aag cct gca gtc ctg gaa gcg cga ggg cct caa agg ccc gct cta

631: cat ctt ctg cct tag tct cag ttt gtg tgt ctt aat tat tat ttg

676: tgt ttt aat tta aac acc tcc tca tgt aca tac cct ggc cgc ccc

721: ctg ccc ccc agc ctc tgg cat tag aat tat tta aac aaa aac tag

766: gcg gtt gaa tga gag gtt cct aag agt gct ggg cat ttt tat ttt

811: atg aaa tac tat tta aag cct cct cat ccc gtg ttc tcc ttt tcc

856: tct ctc ccg gag gtt ggg tgg gcc ggc ttc atg cca gct act tcc

901: tcc tcc cca ctt gtc cgc tgg gtg gta ccc tct gga ggg gtg tgg

946: ctc ctt ccc atc gct gtc aca ggc ggt tat gaa att cac ccc ctt

991: tcc tgg aca ctc aga cct gaa ttc ttt ttc att tga gaa gta aac

FIG.5B

UBSTITUTE SHEET

8/9

1036: aga tgg cac ttt gaa ggg gcc tca ccg agt ggg ggc atc atc aaa
1081: aac ttt gga gtc ccc tca cct cct cta agg ttg ggc agg gtg acc
1126: ctg aag tga gca cag cct agg gct gag ctg ggg acc tgg tac cct
1171: cct ggc tct tga tac ccc cct ctg tct tgt gaa ggc agg ggg aag
1216: gtg ggg tcc tgg agc aga cca ccc cgc ctg ccc tca tgg ccc ctc
1261: tga cct gca ctg ggg agc ccg tct cag tgt tga gcc ttt tcc ctc
1306: ttt ggc tcc cct gta cct ttt gag gag ccc cag cta ccc ttc ttc
1351: tcc agc tgg gct ctg caa ttc ccc tct gct gct gtc cct ccc cct
1396: tgt cct ttc cct tca gta ccc tct cag ctc cag gtg gct ctg agg
1441: tgc ctg tcc cac ccc cac ccc cag ctc aat gga ctg gaa ggg gaa
1486: ggg aca cac aag aag aag ggc acc cta gtt cta cct cag gca gct
1531: caa gca gcg acc gcc ccc tcc tct agc tgt ggg ggt gag ggt ccc
1576: atg tgg tgg cac agg ccc cct tga gtg ggg tta tct ctg tgt tag
1621: ggg tat atg atg ggg gag tag atc ttt cta gga ggg aga cac tgg
1666: ccc ctc aaa tcg tcc agc gac ctt cct cat cca ccc cat ccc tcc

FIG.5C

SUBSTITUTE SHEET

9/9

1711: cca gtt cat tgc act ttg att agc agc gga aca agg agt cag aca
1756: ttt taa gat ggt ggc agt aga ggc tat gga cag ggc atg cca cgt
1801: ggg ctc ata tgg ggc tgg gag tag ttg tct ttc ctg gca cta acg
1846: ttg agc ccc tgg agg cac tga agt gct tag tgt act tgg agt att
1891: ggg gtc tga ccc caa aca cct tcc agc tcc tgt aac ata ctg gcc
1936: tgg act gtt ttc tct cgg ctc ccc atg tgt cct ggt tcc cgt ttc
1981: tcc acc tag act gta aac ctc tcg agg gca ggg acc aca ccc tgt
2026: act gtt ctg tgt ctt tca cag ctc ctc cca caa tgc tga tat aca
2071: gca ggt gct caa taa acg att ctt agt gaa aaa aaa

FIG.5D

SUBSTITUTE SHEET

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US92/10904**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC(5) : Please See Extra Sheet.

US CL : 435/4, 6, 69.1, 172.1, 240.2, 29, 91, 810; 536/26, 27, 28.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/4, 6, 69.1, 172.1, 240.2, 29, 91, 810; 536/26, 27, 28.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, DIALOG

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, VOLUME 179, ISSUED 1988, A. L. SPIERING, "A POTENT DNA SYNTHESIS INHIBITOR EXPRESSED BY THE IMMORTAL CELL LINE SUSM-1", PAGES 159-167, ENTIRE DOCUMENT.	1-15
Y	EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, VOLUME 160, ISSUED 1985, O. M. PEREIRA-SMITH ET AL., "SENESCENT AND QUIESCENT CELL INHIBITORS OF DNA SYNTHESIS MEMBRANE-ASSOCIATED PROTEINS", PAGES 297-306, ENTIRE DOCUMENT.	1-15
Y	EXPERIMENTAL CELL RESEARCH, VOLUME 195, ISSUED 1991, A. L. SPIERING ET AL., "CORRELATION BETWEEN COMPLEMENTATION GROUP FOR IMMORTALITY AND DNA SYNTHESIS INHIBITORS", PAGES 541-545, ENTIRE DOCUMENT.	1-15
Y	J.A.G.S., VOLUME 35, NO. 9, ISSUED 1987, J. R. SMITH, "EXPRESSION OF ANTIPROLIFERATIVE GENES IN SENESCENT CELLS", PAGE 894, SEE THE ABSTRACT.	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"G" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

06 FEBRUARY 1993

Date of mailing of the international search report

23 FEB 1993

Name and mailing address of the ISA/
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Authorized officer

GIAN WANG

Facsimile No. NOT APPLICABLE

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US92/10904

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (5):

C 12 Q 1/00, 1/02, 1/68; C 12 P 21/06, 19/34; C 12 N 5/00, 15/00; C 07 H 19/06, 15/12, 17/00.